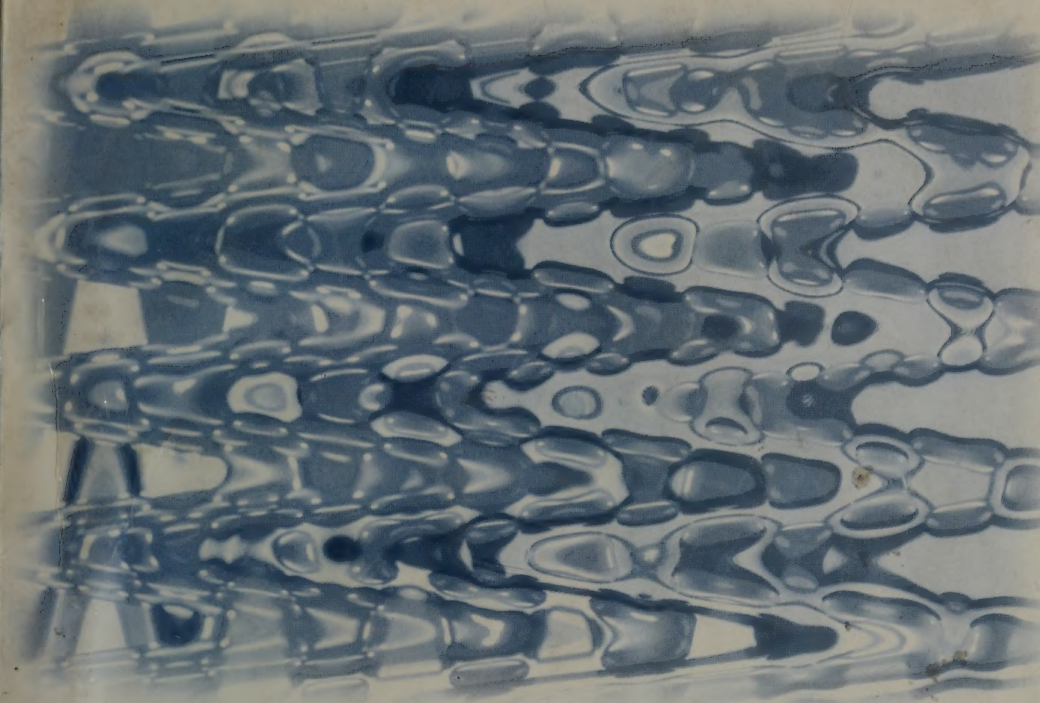
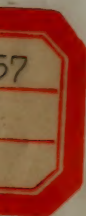


武汉大学本科生系列教材

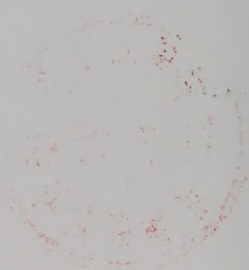


生物化学实验

主编 李如亮



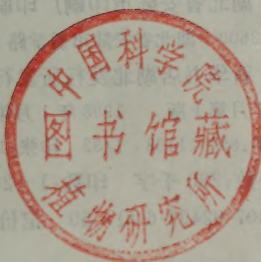
武汉大学出版社



58.173057
273

生物化学实验

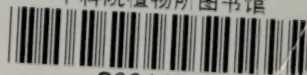
主 编 李如亮
副主编 王延枝 张楚富
吴志平



武汉大学出版社

26743

中科院植物所图书馆



S0014798

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/李如亮主编. —武汉:武汉大学出版社,
1998. 1

(武汉大学本科生系列教材)

ISBN 7-307-02492-6

- I 生…
- II 李…
- III 生物化学—实验
- IV Q5-33

武汉大学出版社出版

(430072 武昌 珞珈山)

湖北省安陆市印刷厂印刷

(432600 湖北省安陆市儒学路4号)

新华书店湖北发行所发行

1998年1月第1版 1998年1月第1次印刷

开本:850×1168 1/32 印张:10.75

字数:280千字 印数:1—2000

ISBN 7-307-02492-6/Q·60 定价:11.80元

本书如有印装质量问题,请寄承印厂调换

书 名

目次

前 言

随着生物化学的发展和生物化学教学内容的不断丰富, 作为生物化学教学的一个重要方面——生物化学实验也在不断更新与提高。1988年, 我们编写了一本生物化学实验讲义作为本科生的实验教材。自那时以来, 我们对实验内容进行了多次修改和补充, 并专门组织人员对新的实验内容进行了检验。这次正式出版的生物化学实验就是在这些工作的基础上并参考了国内外的生化实验教材编写而成的。

在这本生物化学实验教材中, 我们做了一些大胆尝试: ①去掉了许多定性和验证性实验, 加大了定量分析的内容; ②在同一项目实验中, 同时介绍多种方法, 以便让学生根据材料对能达到同一目的的方法进行分析比较; ③以从材料到结果及分析为主线, 分层次、有步骤地介绍实验方法和技术, 使学生有一个完整的实际锻炼过程, 有利于培养学生的设计、分析能力以及独立工作能力。我们希望这些尝试能得到学生的认可。

本实验教材共计 67 个实验, 内容覆盖了当今生物化学研究中常用的方法与技术。大多数实验是由李如亮编写的, 吴志平、王延枝和张楚富也参与了实验编写。刘利东、张西平及李曼铭参与了一些实验工作。全书由李如亮和张楚富统稿。

书中的插图由陈宝联和王莉娟绘制, 生化教研室的老师们对该书的编写与出版给予了很多支持。在此, 我们一并表示谢意。

限于编者的水平,书中难免存在错误之处,望读者批评指正。

编 者

一九九七年九月

目 录

1. 糖的定性鉴定	1
2. 还原糖的测定	5
3. 糖的硅胶 G 薄层层析	14
4. 钼酸铵比色法测定果糖	17
5. 蔗糖的测定——Roe 比色法	19
6. 酚-硫酸法测定己糖含量	21
7. 氨基葡萄糖的测定	23
8. 唾液酸的测定	25
9. 粗脂肪的定量测定	27
10. 中性脂肪的组成	30
11. 碘价的测定(Hanus 法)	32
12. 皂化值的测定	35
13. 卵磷脂的提取和鉴定	37
附:蛋白质分离纯化的一般原则	37
14. 微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	41
15. 双缩脲法测定蛋白质含量	45
16. 福林-酚法测定蛋白质含量	48
17. 紫外吸收法测定蛋白质浓度	54
18. 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量	57
19. 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	59
20. 从牛奶中分离酪蛋白	63

21. α -乳清蛋白的分离和纯化	65
22. α -乳清蛋白的分析鉴定	68
23. 微白蛋白的提取和纯化	75
24. 凝胶过滤层析法测定蛋白质的分子量	79
25. 凝胶层析法的应用	85
26. 血脂蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳	88
27. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	93
28. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-测定 蛋白质的分子量	101
29. 等电聚焦法测定蛋白质等电点	106
30. 蛋白质 N-末端的测定	110
31. 丙氨酸转氨酶活性的测定	119
32. 蛇毒磷酸酶酯的底物专一性实验	121
33. 碱性磷酸酯酶的定性实验	125
34. 硫醇蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶的激活和抑制	128
35. 从鸡蛋清中制备溶菌酶	133
36. 亲和层析法分离乳酸脱氢酶	138
37. 乳酸脱氢酶的垂直板型凝胶电泳	144
38. 酰化酶 I 的制备与检测	148
39. Procion Red HE-3B 柱分离纯化胆绿素还原酶	154
40. 酶活性修饰实验	157
41. 酵母蔗糖酶的部分纯化和性质测定	159
42. 辅酶的测定	176
43. 抗生物素蛋白-生物素复合物:配体结合滴定曲线	183
44. 血红素的光吸收测定	186
45. 维生素 A 的比色测定	188
46. 维生素 B ₁ (硫胺素)的测定	192
47. 维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	197
48. 核酸的定量测定——定磷法	202

49. 核酸的定量测定——定糖法	205
50. 核酸的定量测定——紫外吸收法	210
51. 细胞核的分离	213
52. 染色质结构和组成分析	217
53. 核苷酸的电泳分离鉴定	221
54. 小牛胸腺 DNA 的提取	225
55. 植物 DNA 的提取	227
56. 从细菌细胞中提取 DNA	229
57. DNA 的 T_m 值的测定	234
58. 兔肝 RNA 的制备	239
59. 大肠杆菌 ColE1 质粒的大量制备与纯化	241
附一碱裂解法大量制备质粒	246
附二 SD-裂解法大量制备质粒 DNA	248
60. 限制性内切酶对质粒 DNA 的消化	250
61. Southern 印迹	254
62. PCR 技术	257
63. 柠檬酸合酶的抑制	260
64. 乳糖合成酶——一种酶调节系统	265
65. 大肠杆菌中蛋白质合成的抑制	270
66. 血清胆固醇的测定	274
67. 血液中尿素的测定	276
 附录一 生物化学实验室规则	 278
附录二 实验室安全及防护知识	280
附录三 实验室常识	284
附录四 常用数据表	288
附录五 常见蛋白质分子量参考值	295
附录六 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算	298
附录七 某些生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数	300

附录八	硫酸铵饱和度常用表.....	301
附录九	缓冲溶液.....	304
附录十	层析数据表.....	329

317	22. 聚合酶链式反应(PCR).....	329
321	23. 核苷酸的电泳分离.....	330
322	24. 小分子物质DNA的提取.....	331
323	25. 植物DNA的提取.....	332
323	26. 从细菌细胞中提DNA.....	333
324	27. DNA的Tm值的测定.....	334
325	28. 禽肝RNA的制备.....	335
326	29. 大肠杆菌ColE1质粒的大量制备与纯化.....	336
326	30. 一种简便快速大量制备质粒DNA.....	337
327	31. Southern印迹.....	338
327	32. PCR技术.....	339
328	33. 核苷酸合成的抑制.....	340
328	34. 北戴河台站——一种新型中核反应堆.....	341
329	35. 大肠杆菌中蛋白质的合成.....	342
329	36. 在细胞内合成的蛋白质.....	343
329	37. 在细胞中合成的蛋白质.....	344
329	38. 在细胞中合成的蛋白质.....	345
329	39. 在细胞中合成的蛋白质.....	346
329	40. 在细胞中合成的蛋白质.....	347
329	41. 在细胞中合成的蛋白质.....	348
329	42. 在细胞中合成的蛋白质.....	349
329	43. 在细胞中合成的蛋白质.....	350
329	44. 在细胞中合成的蛋白质.....	351
329	45. 在细胞中合成的蛋白质.....	352
329	46. 在细胞中合成的蛋白质.....	353
329	47. 在细胞中合成的蛋白质.....	354
329	48. 在细胞中合成的蛋白质.....	355
329	49. 在细胞中合成的蛋白质.....	356
329	50. 在细胞中合成的蛋白质.....	357
329	51. 在细胞中合成的蛋白质.....	358
329	52. 在细胞中合成的蛋白质.....	359
329	53. 在细胞中合成的蛋白质.....	360
329	54. 在细胞中合成的蛋白质.....	361
329	55. 在细胞中合成的蛋白质.....	362
329	56. 在细胞中合成的蛋白质.....	363
329	57. 在细胞中合成的蛋白质.....	364
329	58. 在细胞中合成的蛋白质.....	365
329	59. 在细胞中合成的蛋白质.....	366
329	60. 在细胞中合成的蛋白质.....	367
329	61. 在细胞中合成的蛋白质.....	368
329	62. 在细胞中合成的蛋白质.....	369
329	63. 在细胞中合成的蛋白质.....	370
329	64. 在细胞中合成的蛋白质.....	371
329	65. 在细胞中合成的蛋白质.....	372
329	66. 在细胞中合成的蛋白质.....	373
329	67. 在细胞中合成的蛋白质.....	374
329	68. 在细胞中合成的蛋白质.....	375
329	69. 在细胞中合成的蛋白质.....	376
329	70. 在细胞中合成的蛋白质.....	377
329	71. 在细胞中合成的蛋白质.....	378
329	72. 在细胞中合成的蛋白质.....	379
329	73. 在细胞中合成的蛋白质.....	380
329	74. 在细胞中合成的蛋白质.....	381
329	75. 在细胞中合成的蛋白质.....	382
329	76. 在细胞中合成的蛋白质.....	383
329	77. 在细胞中合成的蛋白质.....	384
329	78. 在细胞中合成的蛋白质.....	385
329	79. 在细胞中合成的蛋白质.....	386
329	80. 在细胞中合成的蛋白质.....	387
329	81. 在细胞中合成的蛋白质.....	388
329	82. 在细胞中合成的蛋白质.....	389
329	83. 在细胞中合成的蛋白质.....	390
329	84. 在细胞中合成的蛋白质.....	391
329	85. 在细胞中合成的蛋白质.....	392
329	86. 在细胞中合成的蛋白质.....	393
329	87. 在细胞中合成的蛋白质.....	394
329	88. 在细胞中合成的蛋白质.....	395
329	89. 在细胞中合成的蛋白质.....	396
329	90. 在细胞中合成的蛋白质.....	397
329	91. 在细胞中合成的蛋白质.....	398
329	92. 在细胞中合成的蛋白质.....	399
329	93. 在细胞中合成的蛋白质.....	400
329	94. 在细胞中合成的蛋白质.....	401
329	95. 在细胞中合成的蛋白质.....	402
329	96. 在细胞中合成的蛋白质.....	403
329	97. 在细胞中合成的蛋白质.....	404
329	98. 在细胞中合成的蛋白质.....	405
329	99. 在细胞中合成的蛋白质.....	406
329	100. 在细胞中合成的蛋白质.....	407

实验一 糖的定性鉴定

I. Molish 反应—— α -萘酚反应

一、原理

糖在浓硫酸或浓盐酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物,后者与 α -萘酚作用形成紫红色复合物,在糖液和浓硫酸的液面间形成紫环。自由存在和结合存在的糖均呈阳性反应。此外,各种糠醛衍生物、葡萄糖醛酸以及丙酮、甲酸和乳酸均呈颜色近似的阳性反应。它是鉴定糖类存在与否的简便方法。

二、试剂

Molish 试剂:取 5g α -萘酚用 95%乙醇溶解至 100ml,临用前配制,棕色瓶保存。

1%葡萄糖溶液; 1%蔗糖溶液; 1%淀粉溶液。

三、操作方法

取试管,编号,分别加入各种待测糖溶液 1ml,然后加 2 滴 Molish 试剂,摇匀。倾斜试管,沿管壁小心加入约 1ml 浓硫酸,切勿摇动,小心竖直后仔细观察两层液面交界处的颜色变化。用水代替糖溶液,重复一遍,观察结果。记录各管中出现的颜色。

Ⅱ. 蒽酮反应

一、原理

糖经浓酸作用后生成的糠醛及其衍生物与蒽酮(10-蒽-9,10-二氢蒽)作用生成蓝绿色复合物。

二、试剂

蒽酮溶液,取 0.2g 蒽酮溶于 100ml 浓硫酸中,当日配制。
待测糖溶液,同 Molish 试验。

三、操作方法

取试管,编号,均加入约 2ml 蒽酮溶液,再向各管滴加 5 滴各种待测糖溶液,充分混匀,观察各管颜色变化并记录。

Ⅲ. 酮糖的 Seliwanoff 反应

一、原理

酮糖在酸作用下较醛糖更易生成羟甲基糠醛,随后与间苯二酚作用生成鲜红色复合物。反应仅需 20~30 秒。醛糖在浓度较高时或长时间煮沸,也能产生阳性反应。

二、试剂

Seliwanoff 试剂:0.5g 间苯二酚溶于 1 升盐酸($H_2O : HCl = 2 : 1$)(V/V)中,临用前配制。
待测糖溶液:1%葡萄糖,1%蔗糖,1%果糖。

三、操作方法

取试管,编号,各加入 Seliwanoff 试剂 1ml。再依次分别加入

待测糖溶液各 4 滴,混匀,同时放入沸水浴中,比较各管颜色的变化过程。

IV. Tollen 试验

一、原理

戊糖在浓酸作用下脱水生成糠醛,后者与间苯三酚作用生成深红色物质。本反应并非专门对戊糖特异,有些己糖(果糖、半乳糖)及糖醛酸等亦呈阳性反应,但以戊糖速度最快。

二、试剂

Tollen 试剂:2%间苯三酚乙醇(95%)溶液 3ml,缓缓加入浓盐酸 15ml 及蒸馏水 9ml 即成,需临用前配制。

待测糖溶液:1%阿拉伯糖;1%半乳糖;1%葡萄糖。

三、操作方法

取几支干净试管,编号,各加入 1ml Tollen 试剂,分别加入 1 滴待测糖溶液后混匀,置沸水浴中加热,观察颜色变化及次序。

V. Benedict 试验

一、原理

Benedict 试剂和 Fehling 试剂(费林试剂)均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液,能使还原糖氧化成酸类化合物,而其自身被还原成红色或黄色的 Cu_2O 。

这两个方法常用作还原糖的定性或定量试验。Benedict 试剂利用柠檬酸作为 Cu^{2+} 的络合剂,其碱性较 Fehling 试剂弱,灵敏度高,干扰因素少。

二、试剂

Benedict 试剂:将 170g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) 和 100g 无水碳酸钠溶于 800ml 水中,另将 17g 硫酸铜溶于 100ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中,边加边搅,最后补足至 1000ml(如有沉淀需过滤,可长期使用)。

待测糖溶液:1%葡萄糖溶液;1%蔗糖溶液;1%淀粉溶液。

三、操作方法

加 2ml Benedict 试剂和 1ml 待测糖溶液于试管中,沸水浴中加热 5 分钟,取出后冷却,观察各管中的颜色变化。

VI. Barford 试验

一、原理

单糖在弱酸性溶液中具有还原作用。Barford 试剂为弱酸性。单糖在 Barford 试剂的作用下能将 Cu^{2+} 还原成砖红色的氧化亚铜,时间约 3 分钟。但 Cu_2O 沉淀量少,应观察试管底部的 Cu_2O 沉淀。还原二糖在 20 分钟左右也可产生阳性反应。非还原性二糖经水解后也可产生阳性反应。

二、试剂

Barford 试剂:16.7g 乙酸铜溶于近 200ml 水中,加 1.5ml 冰醋酸,定容至 250ml 即可。

待测糖溶液:1%葡萄糖;1.0%蔗糖;1%淀粉溶液。

三、操作方法

分别加入 2ml Barford 试剂和 1ml 待测糖溶液于试管中,煮沸 2~3 分钟,放置 20 分钟以上,比较各管颜色变化。

实验二 还原糖的测定

还原糖是指含有自由醛基和酮基的单糖类以及某些二糖,如乳糖、麦芽糖。

糖的测定方法有物理法(如折光率、比旋度的变化)和化学法,其中以化学法常用且准确。

还原糖的定量测定基础是:在碱性溶液中还原糖能将二价铜离子等金属离子还原成一价离子,而糖本身氧化成各种羧酸。

利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同可把它们彼此分开,进而测得生物材料中可溶性还原糖的多少。利用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成具有还原性的单糖,就可知道生物样品中的总糖。

在介绍糖类的测定方法之前首先谈谈生物材料的处理问题。在分析生物材料的糖类物质之前要进行预处理,所谓预处理主要包括四个方面的内容:一是生物材料的糖分提取;二是除去糖测定过程中的干扰物质,诸如植物组织中的单宁、色素、蛋白质等以及动物血液中的蛋白质等;三是如果要测定低聚糖或多聚糖,则要对样品进行水解处理,使其转化为单糖后再测定;四是在必要时还要对生物组织提取液中的各种糖类进行分离,然后进行测定。

1. 植物材料的一般处理方法

植物材料中的糖存在于细胞中,因此必须先将被分析植物材料进行研磨,使之成糊状或粉状物,然后依据糖易溶于水这一性质,加入一定量的蒸馏水,并在 $75\sim 80^{\circ}\text{C}$ 的水浴上加热 1 小时,再定容过滤,取滤液测定糖的含量。对某些含有大量淀粉的植物材

料,在用水提取糖分时,常会使其部分或全部地带入到提取液中,从而使测定结果偏高,此时可用 25%~85%的乙醇回流提取约 30 分钟,提取几次后合并之,再蒸去乙醇,用水定容后再测定糖的含量。

植物材料中如含有其它的还原性物质和蛋白质时,可用 10% 中性或碱性乙酸铅溶液沉淀去除之。具体方法是将乙酸铅一滴滴加入到热的未定容的提取液中,待沉淀完全时再过滤。向滤液中再逐滴加入饱和硫酸钠以彻底去除铅,滤去沉淀后定容,再测定糖含量。

如果要测定植物材料中的低聚糖,如二糖、三糖等,将植物材料提取液按 16:1(V/V)加入 2% HCl, 80°C 水解半小时,再用饱和碳酸钠中和(以甲基红为指示剂),然后再用乙酸铅除蛋白质,最后测定糖含量。用此糖含量减去未经水解的提取液含糖量即为该液的低聚糖量。

淀粉含量的测定首先是将植物材料磨碎后称量,加入 3% HCl 在沸水浴中水解 1~2 小时,使淀粉彻底水解,冷却后用 10% NaOH 中和至中性。再按前述方法除去干扰物质后测定糖含量,用总糖量减去未经酸水解的提取液含糖量即为淀粉含量。

2. 动物材料——血液的去蛋白方法

(1) 无蛋白血滤液的制备:在血糖含量测定前必须先除蛋白,方法有:

① 钨酸钠-硫酸法:取全血(加抗凝剂)1ml 于 20ml 三角瓶中,加蒸馏水 7ml,摇匀后使溶血,加入 10% 钨酸钠 1ml 并摇匀,然后加入 0.4mol/L H_2SO_4 1ml,随加随摇,加完后充分振荡,放置 5~15 分钟,当沉淀变为暗棕色时,用干滤纸过滤,每毫升滤液相当于 1/10 全血。

② 硫酸锌法

a. 0.45% 硫酸锌 5ml 和 0.1mol/L NaOH 1ml 混合成胶体溶液,然后加入血液 0.1ml,在沸水浴中加热 4 分钟,冷却后用棉花

过滤,滤液可直接用于测定糖含量,尤其是滴定法。

b. 向试管中加入 1ml 0.30mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$,蒸馏水 7.5ml,混匀后加 0.5ml 全血,血清或血浆,混合后放置半分钟,再加入 1ml 5% ZnSO_4 ,混匀后放置 2 分钟,过滤或离心,滤液为 1:20 的无蛋白滤液。

(2) 不溶血的无蛋白血滤液的制备

采用等渗的硫酸钠溶液稀释血液,使血球不受破坏,再用蛋白质沉淀剂去蛋白。

① 硫酸钠-硫酸锌试剂法:取血液 0.1ml,加 1.8ml 硫酸钠-硫酸锌试剂和 0.1ml 0.5mol/L NaOH ,混匀后离心,取上清液测糖含量,上清液为 1/20 全血浓度。

② 等渗硫酸钠和钨酸钠法:取 0.1ml 血液和 3.8ml 等渗硫酸钠-硫酸铜试剂混合后可在室温放置几小时(CuSO_4 可抑制酵解),在测糖前加入 0.1ml 的 10% 钨酸钠溶液,蛋白质沉淀后离心,取上清用于测糖,此血滤液稀释了 40 倍。

注释

1. 抗凝剂:草酸钾 2 克,氟化钠 1.5 克加水 100 毫升。

2. 硫酸锌和氢氧化钡:

0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$: 取 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 94g 用水溶解后定容到 1 升。

5% 硫酸锌。

0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 和 5% 硫酸锌溶液配制后要调节浓度,方法是:100ml 三角瓶中加入 10ml 5% 硫酸锌液和 25ml 水,用酚酞作指示剂,以 0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液滴定至浅红色终点。 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 用量应为 $10.0 \pm 0.1\text{ml}$,否则调整二者的浓度再标定。

3. 硫酸钠-硫酸锌试剂:55ml 10% 硫酸锌溶液(10g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 用水定容至 100ml)加等渗硫酸钠溶液(30g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 或 13.2g 无水硫酸钠用水定容至 1 升)到 1 升即成。

4. 等渗硫酸钠-硫酸铜试剂: 300ml 3% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 30ml 7% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液混合即成。

I. 蒽酮比色法

一、原理

糖在浓硫酸作用下生成糠醛, 产物与蒽酮反应生成蓝绿色复合物。蒽酮法适用于己酮糖和己醛糖的测定, 在 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 范围内其颜色的深浅与糖含量成正比, 但蒽酮也与其它糖(如戊醛糖)反应呈现不同的颜色。由于蒽酮试剂与糖反应的呈色强度随时间变化, 故必须在反应后立即在同一时间内比色。

二、试剂

蒽酮试剂: 将 1.0g 蒽酮溶于 1 升 95% 浓硫酸中, 临用前配制。

糖的标准溶液: 0.1mg/ml 葡萄糖溶液, 0.1mg/ml 果糖溶液, 0.1mg/ml 木糖溶液和 0.1mg/ml 淀粉溶液。几种试剂可同时用, 也可选择其一作标准曲线。

待测糖溶液: 可用无蛋白滤液或 RNA 制品。注意控制糖浓度在 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内。

三、操作方法

1. 制作标准曲线: 取 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 糖标准溶液 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.60, 0.80ml 于试管中, 用水补足到 2ml, 加入 4ml 蒽酮试剂, 摇匀, 沸水浴加热 15 分钟, 流动水冷却后测 OD_{620} 。以含糖数为横坐标, OD_{620} 为纵坐标绘制标准曲线。

2. 未知液的糖量测定: 取待测糖溶液 2ml, 按上一步操作, 读其 OD_{620} 值。利用标准曲线计算出样品含糖量。

II. 3,5-二硝基水杨酸比色法

一、原理

3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后生成棕红色的氨基化合物,在一定范围内还原糖含量与反应液的颜色强度成正比。利用比色法可测定样品中还原糖和总糖含量。

二、试剂

3,5-二硝基水杨酸试剂:6.3g 3,5-二硝基水杨酸和262ml 2mol/L NaOH 加到酒石酸钾钠的热溶液中(182g 酒石酸钾钠溶于500ml 水中),再加5g 重结晶酚和5g 亚硫酸氢钠于其中,搅拌溶解,冷却后定容到1000ml,溶液为黄色,贮于棕色瓶中。

1mg/ml 葡萄糖溶液:精确称取105°C 烘至恒重的葡萄糖1g,用水定容到1升。

6mol/L HCl, 10% NaOH, 碘化钾-碘溶液, 酚酞指示剂(85%乙醇作溶剂)。

三、操作方法

1. 制作标准曲线。取1mg/ml 葡萄糖标准液0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8于试管中,用蒸馏水补足到1.0ml,再加0.5ml 3,5-二硝基水杨酸试剂于各管中,混匀,沸水浴加热5分钟后用流水冷却,每管再加4.0ml 水,摇匀后于540nm 波长处读光密度值。以葡萄糖含量为横坐标,相应的 OD_{540} 为纵坐标作标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖的测定。关于材料的处理前面已作过说明,在此举一例说明。

准确称取藕粉1g 于小烧杯中,先用少量水调成糊状,然后加50ml 水,50°C 保温20分钟,用水定容到100ml,过滤后的滤液可用于还原糖的测定。这是假定样品中无可溶性淀粉而用水提取,若要

严格要求,应该用85%乙醇来提取。

总糖的提取步骤是:准确称取藕粉1g,放入大试管中,加入10ml 6mol/L HCl,15ml 水,沸水浴加热半小时(可用 KI-I₂液检查水解是否完全),冷却后用10%NaOH 调至中性(以酚酞作指示剂),用水定容到100ml,过滤,取滤液再稀释10倍,定容后的溶液可用于总糖的测定。

最后进行样品测定:取还原糖提取液1ml,总糖水解液1ml,然后同制作标准曲线一样操作,读其 OD₅₄₀,在标准曲线上求得相应的还原糖含量(可平行做二到三份样品)。

四、计算结果

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 100$$

Ⅲ. 血糖的测定(Folin-Wu 法)

一、原理

无蛋白血滤液中的葡萄糖与碱性硫酸铜溶液共热,Cu²⁺还原成 Cu⁺(即 Cu₂O),Cu₂O 与钼酸试剂生成蓝色钼化合物。蓝色复合物的生成量与葡萄糖含量成正比,可在420~440nm 范围内比色测定。

二、试剂

葡萄糖标准溶液:取1g 恒重葡萄糖溶于水,定容到100ml。应用时再稀释100倍,其浓度为0.1mg/ml。

碱性铜试剂:

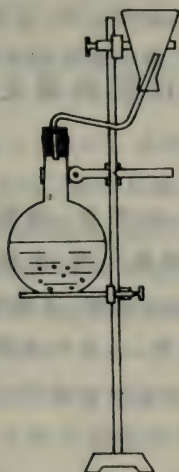
A 液:取35g 无水碳酸钠,13g 酒石酸钾钠,11g 碳酸氢钠,用水定容到1000ml。

B液:5g 晶体硫酸铜用水定容到100ml,可加几滴浓硫酸作保存剂。

临用前取B液1份缓缓加到9份A液中摇匀即可。暗处低温可保存数日。

酸性钼酸盐溶液:取600g 钼酸钠用水定容到2000ml。摇匀后倾入大试剂瓶中,加0.5ml 溴水,摇匀后静置几小时。取上清液500ml 于1000ml 容量瓶中,徐徐加入225ml 85%磷酸,边加边摇匀,再加25%硫酸150ml,置暗处到次日,用空气将剩余的溴驱除(见下图),然后加99%乙酸75ml,摇匀后加水至1000ml,贮于棕色瓶中。

H_2SO_4 ; 10%钼酸钠。



赶溴装置

三、操作方法

无蛋白血滤液的制备方法见前述。

取3支具25ml刻度的血糖管,编号。用奥氏吸管吸取无蛋白血滤液2ml于第一支血糖管内,加2ml葡萄糖标准液于第二支血糖管中,加2ml水于第三支血糖管内。然后各加2ml新鲜配制的碱性铜溶液,混匀后置沸水浴内加热8分钟,取出后流动水冷却,再各加4ml酸性钼酸盐溶液,混匀放置1或2分钟,用蒸馏水稀释到25ml,混匀,于420~440nm处比色测定。

四、结果计算

按下式计算100ml全血中所含血糖的毫克数:

$$\text{样品血糖毫克/100毫升} = \frac{\text{OD 样品}}{\text{OD 标准}} \times \frac{\text{C 标准}}{0.1\text{ml}} \times 100$$

其中,0.1ml是指制备的每毫升无蛋白血滤液相当于0.1ml全血。

IV. 费林试剂热滴定定量法

一、原理

费林试剂是氧化剂,由甲液(硫酸铜、次甲基蓝)和乙液(NaOH、酒石酸钾钠,亚铁氰化钾)组成。甲乙液混合,CuSO₄与NaOH生成天蓝色Cu(OH)₂沉淀。在碱性条件下,酒石酸钾钠与Cu(OH)₂形成可溶性络合物,后者与还原糖进行滴定时进一步生成Cu₂O。亚铁氰化钾可与Cu₂O生成K₂Cu₂Fe(CN)₆。次甲基蓝是氧化还原指示剂。

二、试剂

费林试剂:

甲液:15g CuSO₄·5H₂O和0.05g次甲基蓝溶于1000ml蒸馏水中。

乙液:50g酒石酸钾钠,54g NaOH和4gK₄[Fe(CN)₆]溶于

1000毫升蒸馏水中。

葡萄糖标准液:称取恒重的葡萄糖1g,用少量蒸馏水溶解后加入8ml浓盐酸,再定容到1000ml。

6mol/L HCl; 10%NaOH; 酚酞指示剂。

碘化钾-碘试剂:将2.0g KI 和1.0g 碘溶于10.0ml 蒸馏水中。

三、操作方法

1. 空白滴定

将1mg/ml 的葡萄糖标准液加入到滴定管中。

准确吸取费林试剂甲液、乙液和蒸馏水各5毫升于250毫升锥形瓶中。用滴定管加9ml 葡萄糖标准液于该瓶中。然后将锥形瓶移至电炉上加热至沸腾,再用滴定管以每滴1~2秒的速度继续滴加葡萄糖标准液至锥形瓶中蓝色消失,即为终点。整个过程在沸腾态下进行,勿需摇动。记下消耗葡萄糖的毫升数 V_1 。

2. 总糖滴定

准确称取淀粉1克,加入6mol/L 盐酸10毫升,水15毫升,混匀后用电炉加热沸腾2分钟左右,取出几滴水解液用 $KI-I_2$ 液检查水解程度,若未水解完全则继续进行,直到水解完全为止。冷却后加入酚酞指示剂1滴,用10%NaOH 中和使水解液显微红色。最后定容到100ml,过滤,取滤液10.0ml 再定容到100ml。此为测定总糖的样品液。

准确吸取样品液5ml 于250毫升锥形瓶中,加入费林试剂甲、乙液各5ml,混匀,再按前述方法用标准葡萄糖溶液滴定,记下消耗葡萄糖标准液的毫升数 V_2 。

四、计算

$$\text{总糖}\% = \frac{(V_1 - V_2) \times \text{标准葡萄糖浓度(g/ml)} \times \text{稀释倍数} \times 100}{\text{称取样品量(g)}}$$

实验三 糖的硅胶 G 薄层层析

一、原理

薄层层析是一种微量而快速的层析方法。最早是 Izmailov 和 Schraiber 在1938年采用氧化铝薄层分离了植物提取液。层析是在吸附剂或支持剂均匀涂布的薄层上进行的,故称薄层层析。

为了使所要分析的样品各组分得到分离,必须选择合适的吸附剂。硅胶、氧化铝和聚酰胺是广泛采用的吸附剂,硅藻土和纤维素是分配层析中最常用的支持剂,在吸附剂或支持剂中添加了适合的粘合剂后再涂布,可使薄层粘牢在玻璃板(或涤纶片基)这类基底上。

硅胶 G 是一种添加了粘合剂的硅胶粉,约含12%~13%的石膏(CaSO_4),它可以把一些物质从溶液中吸附于自身的表面上,利用它对各种物质的吸附能力不同,再用适当的溶剂系统展层使不同的物质得以分离。例如糖在硅胶 G 薄层上的移动速度与糖的分子量和羟基数有关,经过适当的溶剂展开后,糖在薄板上的移动速度是戊糖>己糖>双糖>三糖。若用硼酸溶液调制硅胶 G 可改进分离效果。对已分开的斑点显色,而将与它位置相当的另一个未显色的斑点从薄层上与硅胶 G 一起刮下,以适当的溶剂将糖从硅胶 G 上洗脱下来,就可用糖的定量测定方法测出各组分的含糖量。

薄层层析一般采用上行法,在具有密闭盖子的玻璃缸中进行,溶剂倒于缸底,简单地将薄板放入即行。保证层析缸内有充分饱和的蒸气是实验成功的关键。保证措施是在层析缸内壁衬一层浸湿溶剂的滤纸或缩小层析缸的容积。因为层析时,溶剂会从薄层上蒸

发,样品移动到一定距离的时间就会延长。若所用溶剂系统由几个成分组成,挥发性较大的成分首先蒸发,就会使混合溶剂的组分改变,而溶剂的蒸发从薄板的中央向两边递减,致使溶剂前沿呈弯曲状,结果往往使两边的 R_f 值大于中央位置的 R_f 值。

薄层层析与其它方法比有明显的优点:层析时间短,可以分离多种化合物,用样品量少(微克级),与纸层析相比要灵敏10~100倍,观察结果方便,显色方法甚至可以用腐蚀性显色剂。

二、试剂

1%糖标准溶液:取木糖、葡萄糖、果糖和蔗糖各100mg,分别用75%乙醇定容到10ml,其浓度均为10mg/ml。

0.1mol/L 硼酸溶液(H_3BO_3)

层析溶剂:氯仿:甲醇=60:40(V/V)

苯胺-二苯胺-磷酸显色剂:二苯胺1g,苯胺1ml 和85%磷酸5ml 溶于50ml 丙酮中。

三、操作方法

1. 制备硅胶 G 薄层板

取硅胶 G 粉30g 加75毫升0.1mol/L 硼酸溶液,调匀后铺于洁净平整的玻板上,铺层后的薄板于100°C 烘箱中烘干。取出后可用,亦可贮于干燥器中备用。薄层表面要求平整,厚薄均匀。

2. 糖在硅胶 G 薄层上的分离

选制备好的薄板一块,在距底边1.5cm 的直线上选四个点,相互距离2cm。用毛细管分别点上不同的糖样品于四个点,样量控制在5~50 μ g,斑点直径不超过2mm。待薄层上样品自然干燥后,将薄板置于盛有层析溶剂的层析缸中,自下向上展层,当展层溶剂到达离薄板顶端约1cm 处时取出薄板,前沿作一记号,60°C 烘干2~3小时(或空气中晾干),除尽溶剂后均匀地喷上苯胺-二苯胺-磷酸显色剂,85°C 烘10分钟,各种糖则分别显出不同的颜色。记下各斑

点的位置、颜色,计算 R_f 值。

糖种类	木糖	葡萄糖	果糖	蔗糖
呈色	黄绿色	灰蓝绿色	棕红色	蓝褐色

实验四 钼酸铵比色法测定果糖

一、原理

酸性条件下钼酸铵与果糖能生成蓝色复合物,可在650nm波长下比色测定。在一定糖浓度范围内,所形成的蓝色深浅与含糖量成正比,糖浓度的适用范围为10~100 μ g/ml。

本法对果糖测定较灵敏、快速。但对蔗糖也有显色反应,在相同浓度范围内也成直线关系,但呈色较果糖浅,光密度值也较果糖低。对葡萄糖在相同浓度范围内几乎没有显色反应,所以不能用于葡萄糖的测定。

二、试剂

果糖标准溶液(0.1mg/ml):取真空干燥(55 $^{\circ}$ C)24小时的果糖0.100g,溶于100ml水,即为1mg/ml的果糖溶液。再稀释10倍即为0.1mg/ml的果糖标准溶液。

显色剂:

I液:取140ml浓硫酸加入到860ml蒸馏水中。

II液(16%钼酸铵):取80g钼酸铵溶于水中,定容到500ml。

使用前,I液和II液等量相混即成显色剂。

待测样品,浓度在20~40 μ g/ml

三、操作方法

1. 制作标准曲线

取0.1mg/ml果糖标准溶液0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8和1.0ml

于各试管中,用蒸馏水补足到2ml,然后加入4ml 显色剂,摇匀后放入80°C 水浴中保温30分钟,冷却后于650nm 处测定其 OD 值。以果糖量为横坐标,相应的光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品测定

取2ml 待测样品,加入4ml 显色剂,其余同前述操作过程,最后测其 OD_{650} ,于标准曲线上查出果糖含量。

实验五 蔗糖的测定——Roe 比色法

一、原理

六碳糖与浓盐酸作用产生羟甲基糠醛,但酮糖比醛糖产生的羟甲基糠醛要多得多(15%的酮糖与20%的醛糖所产生的羟甲基糠醛量相等)。羟甲基糠醛在一定条件下和酚类化合物——间苯二酚形成鲜红色(Seliwanoff 试验)。在550nm 波长处可比色测定。在一定条件下,本反应可为酮糖所特有,故可以作为酮糖测定的依据。采用此法只要将植物组织研磨后用85%热乙醇多次抽提(见前述实验二),除去乙醇后的提取液即可直接用来测定蔗糖,其中尽管含有葡萄糖、果糖、麦芽糖等,但不影响蔗糖测定,色素对本反应影响较大。

近年来,有人用 NaOH 来破坏植物组织中的果糖,而不用间苯二酚法来测定蔗糖。

在测定过程中加热的温度、时间和试剂的配量对测定结果均有影响,注意控制。

二、试剂

蔗糖标准溶液(0.4mg/ml):取0.100g 恒重蔗糖用水定容到250ml。

间苯二酚溶液:0.1g 间苯二酚用6mol/L HCl 溶解后定容到100ml。

10mol/L HCl

2mol/L NaOH

待测糖溶液, $40 \sim 250 \mu\text{g}/\text{ml}$

三、操作方法

1. 制作标准曲线

取 $0.4\text{mg}/\text{ml}$ 的蔗糖标准溶液 $0, 1.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9\text{ml}$ 分别加到各试管中, 用水补足到 1.0ml , 再加 0.1ml $2\text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液, 混匀后于 100°C 沸水浴中加热 10 分钟(用玻璃球盖住试管口), 立即用流动水冷却, 再加入 1ml 间苯二酚液, 3ml $10\text{mol}/\text{L}$ HCl , 摇匀后放入 80°C 水浴中加热 8 分钟, 冷却后于 500nm 波长处读 OD 值。以蔗糖含量为横坐标, 相应的光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品测定

取待测液 0.9ml (约含 $40 \sim 250 \mu\text{g}/\text{ml}$) 与标准曲线的制作同样操作, 最后测其 OD_{500} 。根据此值在标准曲线上查出蔗糖含量。

实验六 酚-硫酸法测定己糖含量

一、原理

前述的几种己糖比色测定方法中所使用的显色剂,诸如蒽酮、间苯二酚等,都需要沸水浴加热。而本法却不用加热,且蛋白质的存在对本法的显色反应影响不大,可适用于糖蛋白中的己糖测定。本法的重复性和灵敏性均较好。

二、试剂

5%(W/W)酚溶液:5g 重蒸酚加入95ml 蒸馏水,摇匀备用。

浓硫酸,分析纯

己糖标准溶液($50\mu\text{g}/\text{ml}$)

待测己糖溶液

三、操作方法

取0.5ml 内含 $2\sim 25\mu\text{g}$ 中性己糖的溶液置于试管中,加0.3ml 5%酚溶液,混匀后快速加1.8ml 浓硫酸,振摇混匀,室温放置20分钟即可出现橙黄色,可于490nm 处比色测定。室温下过夜,颜色仍旧稳定。其中以水代替糖溶液做比色测定的空白。

例如,取 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的己糖标准溶液0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ml 于各试管中,用水补足到0.5ml,各管含糖量分别是5, 10, 15, 20和 $25\mu\text{g}$,然后同上操作读 OD_{490} 。以含糖量为横坐标,相应的OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

取待测己糖样品液0.5ml(含量在 $25\mu\text{g}$ 以下)同上操作,读其

OD₄₉₀。最后从标准曲线上查出含己糖量。

四、讨论

本法不仅可以测定中性己糖,也可测定其甲基化衍生物。戊糖和6-脱氧己糖也可用此法,但反应产物的最大吸收发生位移。

本法的热量来自浓硫酸与水的混合,因此加浓硫酸时应当快,且立即混匀,试管应大些,以免烫手。

实验七 氨基葡萄糖的测定

一、原理

在碱性溶液中氨基糖与乙酰丙酮于 100°C 下作用形成有色物质,此有色物质在酸性条件下用二甲基氨基苯甲醛处理可呈现红色,在 530nm 处用比色法可定量测定氨基葡萄糖的含量。

二、试剂

乙酰丙酮试剂:1ml 重蒸乙酰丙酮(沸点在 $138\sim 140^{\circ}\text{C}$)溶于50ml 1mol/L Na_2CO_3 溶液中,试剂临用前配前。

对-二甲基氨基苯甲醛试剂(Ehrlich's 试剂):0.8g 对-二甲基氨基苯甲醛溶于30ml 乙醇中,加30ml 浓盐酸。该溶液呈淡黄色。

氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液:精确称取1.0g 氨基葡萄糖盐酸盐,用蒸馏水定容到100ml,再稀释100倍,即为 $100\mu\text{g/ml}$ 的溶液。

无水乙醇。

三、操作方法

1. 制作标准曲线:取6支具刻度试管,分别加 $100\mu\text{g/ml}$ 氨基葡萄糖标准溶液0,0.2,0.4,0.6,0.8和1.0ml,用水补足到2.0ml,加1ml 乙酰丙酮试剂于各管中,摇匀,用玻璃珠封盖管口,沸水浴加热20分钟,再用冷水冷至室温,加5ml 无水乙醇后加1ml 对-二甲基氨基苯甲醛试剂,再以无水乙醇补足反应液总体积到10ml。将试管内各物质充分混匀后置 $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 水浴中温热10分钟,以加速二氧化碳的释放,流动水冷却到室温。以水作空白,于 530nm 处读

其光密度值。以氨基葡萄糖微克数作横坐标, OD_{530} 作纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品测定: 粘多糖、粘蛋白和软骨制备物(样品中氨基己糖的量不低于 $200\mu\text{g}$) 封在安培瓶内, 以 $2\text{ml } 4\text{mol/L HCl}$ 于 100°C 下加热水解14小时。水解后打开安培瓶, 样品经真空干燥后, 残渣用水溶解成一定体积, 使其中氨基己糖的最终浓度约为 $100\mu\text{g/ml}$ 。取一定量的样品水解液按标准曲线绘制同样操作。利用标准曲线计算出样品中氨基己糖的量。

实验八 唾液酸的测定

一、原理

硫代巴比妥酸已被用于多种脱氧糖的测定。唾液酸是一类3-脱氧-2-酮糖酸,故目前该法也用于唾液酸的测定。蛋白质对此有干扰,大量的岩藻糖也会引起552nm 光吸收下降,脱氧核糖的存在可生成红色物质,但其最大光吸收在532nm。

二、试剂

25mmol/L 过碘酸溶液,以0.25mol/L 硫酸作溶剂。

1.6%亚砷酸钠溶液,以0.4%盐酸为溶剂。

0.1mol/L 2-硫代巴比妥的水溶液,用 NaOH 调至 pH9.0。

乙二醇-甲醚或丙酮-盐酸混合液(97.5:2.5)(V/V)。

75 μ g/ml 唾液酸标准溶液

三、操作方法

75 μ g/ml 唾液酸标准溶液

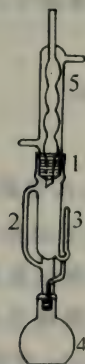
1. 取 75 μ g/ml 唾液酸标准溶液 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20ml 于具塞试管中,用水补足到 0.2ml,加 0.1ml 过碘酸溶液,37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。然后加入 0.1ml 亚砷酸钠液,振摇试管至棕黄色消失。再加入 1.0ml 硫代巴比妥溶液后加塞,在沸水浴中准确加热 7.5 分钟,随即置冰浴中,最后加入 2.0ml 乙二醇甲醚或酸丙酮溶液,振摇至溶液完全混合均匀。于 552nm 处测 OD 值,绘制标准曲线。

2. 样品测定:取一定量的样品用 $0.2\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$, 80°C 水解1小时,然后定容稀释到一定体积,使其中唾液酸的最终浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ 左右。取一定量的水解液同前述操作,测其OD值。从标准曲线上查出唾液酸的含量。

实验九 粗脂肪的定量测定

一、原理

粗脂肪是指包括脂肪、游离脂酸、蜡、磷脂、固醇及色素等脂溶性物质的总称。一般都溶于乙醚、石油醚、苯及氯仿等，不溶于水或微溶于水。利用乙醚在索氏提取器中提取样品的脂肪，然后蒸发乙醚、烘干小瓶，称出瓶中残留物的重量即可得到样品中所含脂肪的含量。索氏提取器装置见图。



二、试剂

无水乙醚。

三、操作方法

1. 称出小瓶重量：将洗净的索氏提取器小烧瓶用铅笔在磨口

处编号,103~105°C 烘2小时,即可达恒重,干燥器内冷却,分析天平称重,并记录。

2. 用分析天平称取干燥样品2g,用滤纸包扎好,放入浸提管内。

3. 回馏:在已称重的小烧瓶内加1/2~1/3体积的无水乙醚。联接索氏提取器各部分,电热板加热回馏2~4小时。控制电热板温度,每小时回馏3~5次较宜。

4. 抽提完毕后,待乙醚完全流回小烧瓶,卸开抽提管,取出滤纸筒,再回馏一次,以洗净残留在提取器上的脂肪。然后卸开抽提管,将乙醚蒸发回收。基本蒸尽时,停止加热,取下小烧瓶,用吹风机将瓶内乙醚在通风柜内吹尽,再置烘箱中103~105°C 烘干(约半小时),取出,干燥器内冷却,称重,从瓶的前后重量差可算出脂肪含量。

同上述,用不包样品的滤纸做空白测定。

5. 计算:

$$\text{含油量}\% = \frac{\text{油脂重量}}{\text{试样重量}} \times 100$$

附: 6. 无水乙醚的制备:水分的去除:含水较多的乙醚,可先于乙醚中投入无水氯化钙(约为总体积的1/3),放置1天后,过滤,水浴蒸馏,收集36°C 蒸出液,再在此蒸出液中加入适量的钠片,1天后蒸馏,收集36°C 蒸出液,即得无水乙醚。含水分较少的乙醚,可于每500g 乙醚中加入30~50g 无水硫酸钠或钠片,1天后蒸馏,收集36°C 蒸出液。

7. 乙醚中过氧化物的去除:将乙醚装入分液漏斗,加入乙醚量1/5的10%硫酸亚铁,充分混和后,澄清分层,放出水层。

8. 过氧化物的鉴定法:6ml 乙醚于试管中,加2ml 10%碘化钾溶液,猛烈混和,放置1分钟,下层碘化钾呈黄色即表明有过氧化物存在。

9. 10%硫酸亚铁:100g FeSO_4 溶于600ml 水中,再加30ml 浓硫酸酸化,再稀释至1000ml。

10. 乙醚中乙醇的去除:加乙醚量1/5的10%氢氧化钾溶液洗涤,洗后放出水溶液,重复2~3次。

实验十 中性脂肪的组成

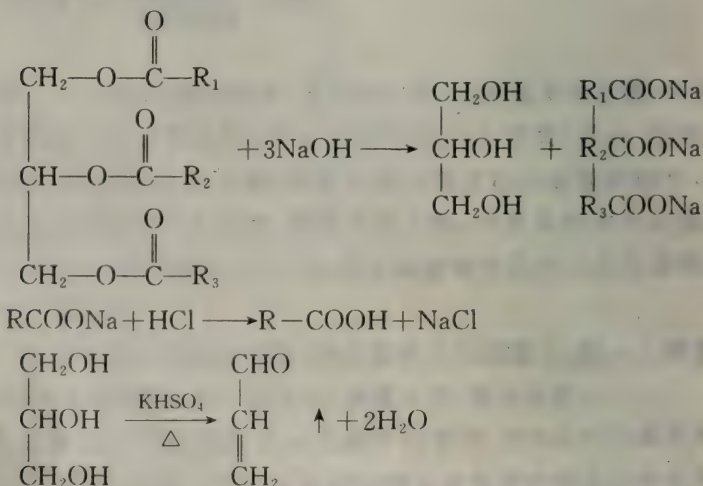
一、原理

中性脂肪也叫真脂,由脂酸和甘油形成的酯。在酸、碱或酯酶的作用下可被水解。如以碱作催化剂,产物是甘油和能溶于水的盐类(即皂),此过程即为皂化作用。

皂用酸水解可产生不溶于水的脂肪酸。

甘油与脱水剂(诸如 P_2O_5 , $CaCl_2$, $KHSO_4$, 无水 Na_2SO_4) 共热,或单独加热到 $450^\circ C$ 以上时可脱水形成丙烯醛,它具有特殊气味,可辨别。丙烯醛可将银离子还原成金属银。

化学反应式如下:



二、试剂

脂肪(猪油或其它脂肪);95%乙醇;浓盐酸;乙醚;苯;氯化钙;甘油;40%(W/V)NaOH 溶液。

三、操作方法

1. 皂化作用:取0.7g 猪油(液体约30滴)于100ml 锥形瓶中,加10ml 0.5mol/L 氢氧化钠-乙醇溶液,在瓶口上插一小漏斗,漏斗上再盖一块表玻璃,然后在沸水浴中加热约1小时。反应完成后移去漏斗,继续加热除去乙醇。再加入10ml 蒸馏水,加热,使皂化物溶解成混合液。

2. 脂肪酸与甘油的分离:上述溶液,加浓盐酸(约5ml)使之呈酸性,加热,可见脂肪酸呈油状浮于上层时,用分液漏斗分开上下层。上层用热水重复洗涤三次,每次用水100ml,除去混杂于脂肪酸中的无机盐、甘油、盐酸等,静置澄清,上清液即为脂肪酸。

下层(即分层脂酸时的水层)置蒸发皿中于蒸汽浴上蒸干,加入少量乙醇(约5~10ml),再蒸干,残留物大部分为 NaCl 及少量甘油,用35ml 乙醇,分3次提取并略加热以助提取完全,合并3次所得提取液,置蒸发皿内,在水浴上蒸发至浆状。

3. 甘油的鉴定及脂酸的性质:取分离出的甘油少许于试管中,加少量 CaCl_2 或 KHSO_4 混匀,小心加热,注意气味变化,或取一滤纸条,滴上数滴 AgNO_3 液及数滴氨水,将此湿纸条挂在试管口,注意气味及滤纸的变化。取分离出的脂肪酸置烘箱中($90\sim 95^\circ\text{C}$)干燥,检验脂酸在水、乙醚及苯中的溶解度。再取一点脂酸用95%乙醇溶解,用石蕊试纸检验其酸碱性。

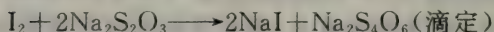
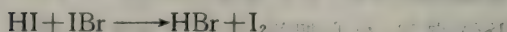
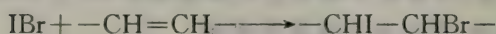
实验十一 碘价的测定(Hanus 法)

一、原理

利用脂肪中的不饱和键和卤素的加成反应可以测定油脂的不饱和程度。每100克脂肪在一定条件下所吸收碘的克数称为该脂肪的碘价。碘价的高低表示脂肪不饱和度的大小。

测定碘值的方法很多,多数方法应用以下原理:把含脂肪样品溶于惰性溶剂,加入过量的卤素或卤素本身的化合物(IBr , ICl)标准溶液,使卤素与脂肪起加成反应。通常再加 KI ,使其与未反应的卤素反应释放出碘,再用标准的硫代硫酸钠滴定释放出来的碘。

本法的化学反应如下:



二、试剂

Hanus 试剂:取13.20g 升华碘溶于1000ml 冰醋酸内,溶时可将冰醋酸分次加入,并置水浴上加热助溶,冷后加溴约3毫升,贮于棕色瓶。

15%碘化钾溶液。

1%淀粉溶液:可加少量苯甲酸钠或水杨酸防腐(1.25mg/ml)。

氯仿或四氯化碳。

0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液:取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 25克于经煮沸后刚冷却的蒸馏水中(无 CO_2 存在),添加0.2g 无水碳酸钠或3.6g 硼砂或0.8g 氢氧化钠,定容到1000毫升,棕色瓶贮藏,二周后过滤,标定,备用。

附:醋酸还原性检查方法及 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的标定

①冰醋酸的还原性检查:取2ml 冰醋酸加少许重铬酸钾及硫酸。若呈绿色,则证明有还原物质存在

② $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的标定

0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液的标定方法:称取 110°C 下烘至恒重的基准重铬酸钾0.2g,精确到0.0002克,溶于250ml 的煮沸并冷却的水中,加2克碘化钾及20ml 2mol/L 硫酸,待碘化钾溶解后置于暗处放10分钟,定容到500ml 后,用0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液滴定,近终点时(变为黄色)加3ml 0.5%淀粉溶液,继续滴定至溶液由蓝色转变为亮绿色,同时作空白试验。

计算:

$$M(\text{硫代硫酸钠溶液}) = \frac{G}{V(\text{硫代硫酸钠}) \times 0.04903}$$

其中:G 为重铬酸钾的重量(克),

0.04903为每毫摩尔重铬酸钾的克数。

三、操作方法

准确称取油量(猪油0.5克,花生油0.3~0.4g),置于碘瓶中(同时作空白对照),加10ml 氯仿(或四氯化碳)作溶剂,立即振荡充分溶解,混匀,然后用滴定管加入25ml Hanus 试剂,勿沾在瓶颈处,塞好瓶塞,轻轻摇动(勿使溶液溅至瓶颈部及塞上),混匀后,置暗处(20°C 左右)放置30分钟,促使加成反应完全。然后注入少量15%碘化钾溶液于碘瓶口边上,将玻塞稍稍打开,使碘化钾溶液流入瓶内,并继续由瓶口边缘加入 KI 溶液,共20ml,再加水100ml,

混匀,在不断振荡下用标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定。起初可以快些,当溶液由棕红色变成淡黄色时,加入 1ml 1% 淀粉溶液,继续滴定至蓝色消失为止。(当蓝色极淡时,可加塞振荡,使与溶于氯仿中的碘完全作用,继续滴定至蓝色刚好消失为止)。记录所用硫代硫酸钠溶液量。

按下式计算:

$$\text{碘价} = \frac{(V_2 - V_1) \times M}{W} \times \frac{158}{1000} \times 100$$

式中: V_2 为滴定空白所耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液之毫升数;

V_1 为滴定样品所耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液的毫升数;

M 为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液的摩尔浓度;

W 为样品重量(克)。

实验十二 皂化值的测定

一、原理

脂肪的碱水解为皂化作用,水解1克脂肪所需要氢氧化钾的毫克数即为皂化值。脂肪的皂化值与其分子量成反比,脂肪的分子量决定于构成它的脂肪酸的碳链的长短,所以皂化值与脂肪酸的分子量亦成反比。由皂化值可知脂肪的平均分子量。

本实验用过量的氢氧化钾乙醇溶液与脂肪起皂化作用,然后用标准的酸来滴定剩余的氢氧化钾。

二、试剂

0.5mol/L 氢氧化钾乙醇溶液;0.5mol/L 标准盐酸;1%酚酞指示剂;猪油或其它植物油。

三、方法

准确称取油样2g于250毫升三角瓶中。用滴定管准确加入0.5mol/L 氢氧化钾乙醇溶液25ml,在锥形瓶上装冷凝管于沸水浴中回馏30~60分钟,至瓶内的脂肪完全皂化为止(瓶内液体澄清并无油珠出现)。取下回馏装置,在锥形瓶内加1%酚酞指示剂2滴,然后用0.5mol/L 盐酸标准液滴定至终点,记录盐酸用量,另外作空白试验。

计算:

$$\text{皂化值} = \frac{(V_2 - V_1) \times M \times 56.11}{W}$$

式中: V_2 为空白所耗的 0.5mol/L HCl 的毫升数;

V_1 为样品所耗的 0.5mol/L HCl 的毫升数;

M 为盐酸的摩尔浓度;

W 为样品的重量(g)。

实验十三 卵磷脂的提取和鉴定

一、原理

卵磷脂在脑、神经组织、肝、肾上腺和红细胞中含量较多，蛋黄中含量特别多。卵磷脂易溶于醇、乙醚等脂溶剂，可利用这些溶剂提取，但不溶于水和丙酮。新提取的卵磷脂为白色蜡状物，与空气接触后因所含不饱和脂酸被氧化而呈黄褐色。卵磷脂中的胆碱在碱性溶液中可分解成三甲胺，而具有特异的鱼腥臭味，可用于鉴别。

二、试剂

鸡蛋黄，95%乙醇，10%NaOH溶液。

三、操作方法

1. 提取：取蛋黄约2g置于小烧杯内，加入15毫升热的95%乙醇，边加边搅，冷却后过滤。如滤液不清需重滤，直至透明为止。将滤液置蒸发皿内在蒸汽浴上蒸干，残留物即为卵磷脂。

2. 三甲胺试验：取制得的卵磷脂少许置于试管中，加2毫升10%NaOH溶液并在水浴上加热，注意是否有鱼腥味产生。

3. 另取少许卵磷脂溶于1ml乙醇中，添加1~2ml丙酮，观察变化。

蛋白质分离纯化的一般原则

蛋白质的分离和提纯是生物化学研究中不可缺少的工作。蛋

白质在组织或细胞中以复杂的混合物形式存在，每种类型的细胞内又含有上千种不同的蛋白质。因为蛋白质种类繁多、性质各异，又处在不同的体系中，因此不可能有一个固定的程序适合于各类蛋白质的分离工作，但多数分离工作的关键部分、基本手段还是相同的。蛋白质提纯的总目标是增加制品的纯度或比活性，即增加单位蛋白质重量中所要蛋白质的含量或生物活性（以活性单位/毫克蛋白表示），设法除去变性的和不要的蛋白质，并希望所得蛋白质的产量达到最高值。

分离提纯某一特定蛋白质的一般程序可分为前处理、粗分级和细分级三步。

1. 前处理：首先使要分离的蛋白质从原来的组织或细胞中以溶解的状态释放出来，并保持原来的天然状态（不丢失生物活性），为此应根据不同的情况选择适当的方法将组织和细胞破碎。动物组织的细胞膜可用电动捣碎机或匀浆器破碎。植物和细菌的细胞壁可以用超声波，并加沙研磨等机械方法破碎，低温冰冻、化学试剂及溶菌酶（纤维素酶）等处理也较为常用，破壁后再用适当的溶剂（一般为缓冲液）把蛋白质提取出来。

如果所要的蛋白质主要集中在某一细胞组分中，如细胞核、染色体、核糖体或可溶性的细胞浆等，则可用差速离心方法将它们分开，收集该细胞组分作为下一步提纯的材料。如果待纯化蛋白质是与细胞膜或膜质细胞器结合的，则必须利用超声波或去污剂使膜结构解聚，然后用适当介质提取。

2. 粗分级：获得蛋白质溶液后，再用适当的方法将所需蛋白质与其它蛋白质分开。一般采用等电点沉淀、盐析和有机溶剂分级分离等，这些方法简便，处理量大，能除去大量杂质，又能浓缩蛋白质溶液。

3. 细分级：经过粗分级的蛋白质一般大部分杂蛋白已去除，且体积小，进一步可用离子交换、凝胶过滤、吸附层析和亲和层析等方法纯化，甚至可用电泳法，如区带电泳、等电聚焦等进行

高度纯化。此阶段规模小，分辨率高。

蛋白质分离提纯的最后目标往往是制成晶体。结晶本身表明其天然活性的存在，同时也是一个进一步纯化的过程。蛋白质纯度愈高，浓度愈浓，愈容易结晶。

在制备有生物活性的蛋白质（包括酶）时，均需注意上述各步骤中蛋白质的变性、蛋白酶的作用以及微生物的污染等，总的原则是要求条件温和，并加入少量抑菌剂。

对于蛋白质分离纯化的方法，可根据蛋白质的分子大小、溶解度、电荷、吸附性质以及对其它分子的生物学亲和力等来加以选择。

(1) 根据分子大小采用的方法：透析和超过滤、密度梯度离心和凝胶过滤。

(2) 利用溶解度差异常用的方法：等电点沉淀、盐溶和盐析、有机溶剂沉淀法、温度控制。

(3) 根据电荷不同采用的方法：电泳和离子交换层析法。

(4) 蛋白质的选择性吸附：如以羟基磷灰石、活性炭、硅胶、氧化铝和磷酸钙凝胶为吸附剂的层析方法。

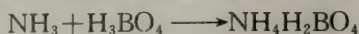
(5) 根据配基的特异性分离方法——亲和层析。

在蛋白质的分离提纯过程中，经常需要测定蛋白质的含量和检查某一蛋白质的提纯程度，即蛋白质的定性定量测定。蛋白质含量测定法有凯氏定氮法、双缩脲法、福林-酚试剂法、染色法和紫外吸收法。蛋白质纯度的鉴定通常是采用物理化学的方法，如电泳分析、沉降分析、扩散分析等，应该注意的是任何单独一种鉴定只能认为是蛋白质分子均一性的必要条件而不是充分条件。较新的纯度鉴定方法有高效（或高压）液相层析（HPLC）技术和毛细管电泳技术。

分离纯化后的蛋白质需要用妥善的方法进行保存，最常见的方法是将蛋白质冷冻干燥后以粉末的形式低温保存（最好 -20°C ），避免以溶液的形式冷冻保存并反复融化使用。溶液状态在

低温保存的时间不宜过长,时间长了易被混入的蛋白酶所分解,若需要以溶液的形式在低温保存时,则可在蛋白质样品中添加 50% 的甘油,这样至少在 -20°C 不会冰冻。

终点,此时所耗的盐酸量即为氨的量。



为了加速消化,可加入 CuSO_4 作催化剂,硫酸钾或硫酸钠可提高溶液的沸点。此外硒汞混合物或钼酸钠可作为催化剂,且可缩短作用时间, H_2O_2 也可加速反应。

二、试剂

样液:1g 卵清蛋白溶于 0.9%NaCl 液,并稀释至 100ml。如有不溶物,离心取上清液备用。

浓硫酸(A. R.)。

硫酸钾:硫酸铜=3:1(W/W)混匀研成粉末。

30%氢氧化钠溶液:30gNaOH 溶于蒸馏水,释至 100ml。

2%硼酸溶液:2g 硼酸溶于蒸馏水,释至 100ml。

混合指示剂:0.1%甲基红酒精溶液和 0.1%甲烯蓝酒精溶液按 4:1 比例(V/V)混合。本指示剂在 pH5.2 时为紫红色,pH4.5 时为暗蓝(或灰色)色,pH5.6 时为绿色,变色点 pI 为 5.4。

0.01mol/L 标准盐酸溶液:用恒沸盐酸准确稀释。

三、操作方法

1. 消化:取两个凯氏烧瓶编号,一只加 1.0ml 蒸馏水作为空白对照,另一只加 1.0ml 样液。然后加硫酸钾-硫酸铜混合物约 20mg 及浓硫酸 2ml。烧瓶口插一漏斗(作冷凝用),烧瓶置通风橱内的消化架或电炉上加热消化。开始时应控制火力,勿使瓶内液体冲至瓶颈。待瓶内水汽蒸完,硫酸开始分解释放出 SO_2 白烟后,适当加强火力,直至消化液透明并呈淡绿色为止(约 2~3 小时),冷却,准备蒸馏。

2. 蒸馏:取 50~100ml 锥形瓶 3 只,先按一般方法洗净,再用蒸汽洗涤数分钟,冷却,用吸管各加入 2%硼酸溶液 5.0ml 及指示剂

4 滴。如瓶内液体呈葡萄紫色,可再加硼酸液 5.0ml,盖好备用。如锥形瓶内液体呈绿色,需用蒸汽重新洗涤。

微量凯氏定氮仪实际上是一套蒸馏装置,蒸汽发生器内盛有加入数滴 H_2SO_4 的蒸馏水和数粒沸石。加热后,产生的蒸汽经贮液管、反应室至冷凝管,冷凝之液体流入接受瓶。每次使用前,需用蒸汽洗涤 10 分钟左右(此时可用一小烧杯承接冷凝的水)。然后将一只盛有硼酸液和指示剂的锥形瓶置冷凝管下端,并使冷凝管之管口插入酸液内,继续蒸馏 1~2 分钟,如硼酸液颜色不变,表明仪器已洗净,否则再洗。移去酸液,蒸馏 1 分钟,用水冲洗冷凝管口,吸去反应室残液。

将消化好的消化液,由小漏斗加入反应室,用蒸馏水洗涤凯氏烧瓶 2 次(每次约 2ml),洗涤液皆由小漏斗加入反应室,再在冷凝管下置一盛有硼酸液及指示剂的锥形瓶,并使冷凝管口插入酸液液面下约 0.5cm 处(10ml 酸液置于 50~100ml 锥形瓶内,液体厚度不大,可将锥形瓶斜放。冷凝管口必须插在液面下,但也不宜太深,这样,万一发生倒吸现象时,硼酸液不致吸入反应室内)。

用小量筒取 10~15ml 30% NaOH 液,倒入小漏斗,放松弹簧夹,让 NaOH 液缓缓流入反应室,当小漏斗内仍有少量 NaOH 液时,即夹紧夹子,再加入约 3ml 蒸馏水于小漏斗内,同样缓缓放入反应室,并留少量水在漏斗内作水封。至此,即可蒸馏。

开始蒸馏后,即应注意硼酸溶液颜色变化。当酸液由葡萄紫色变成绿色后,再蒸馏 3 分钟,然后降低锥形瓶,使冷凝管口离开酸液液面约 1cm,再蒸馏 1 分钟,用少量蒸馏水冲洗冷凝管口,移去锥形瓶,盖好,准备滴定。

3. 定氮仪的洗涤:定氮仪每用一次必须先把反应室内残液吸去,洗净。如用煤气灯加热,熄灭煤气灯,甚至再用冷湿抹布包在蒸汽发生器外,降低烧瓶内温度,使反应室内残液倒吸至贮液管内。用电炉加热时,即使切断电源,电炉余热仍较高,倒吸效果不好。为此在蒸汽发生器和贮液管间加一个三通活塞,蒸馏时使蒸汽发生

器仅与贮液管相通,蒸汽进入反应室。需倒吸时,转动三通活塞使蒸汽外逸,不进入贮液管,此时由于贮液管温度突然下降,即可将反应室残液吸至贮液管。

4. 滴定:用 0.01mol/L HCl 溶液滴定锥形瓶中的硼酸液至呈浅葡萄紫色,记录所耗 HCl 溶液量。

5. 计算:

$$\frac{(A-B) \times M \times 14.008 \times 100}{C} = \text{样品含氮量 mg\%}$$

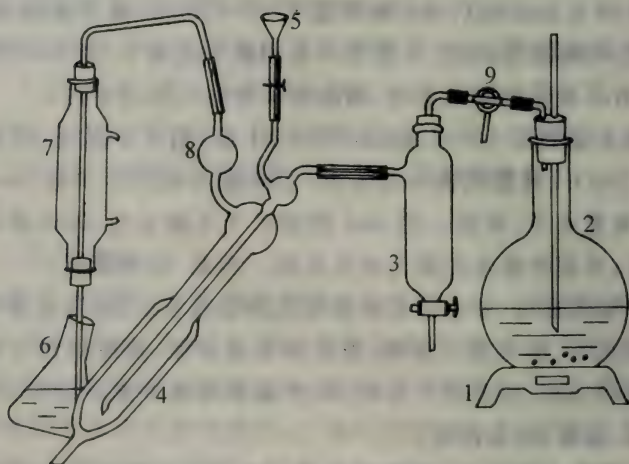
A=滴定样品用去的 HCl 液毫升数;

B=滴定空白用去的 HCl 液毫升数;

C=相当于未释样品的毫升数;

M=盐酸之浓度;

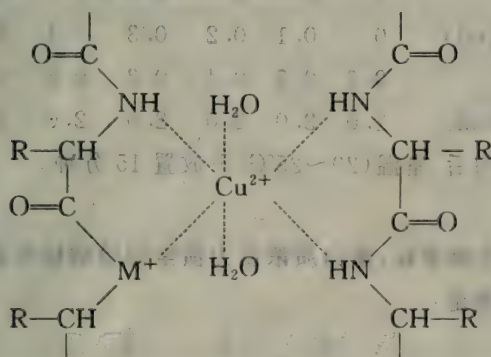
14.008=氮之原子量。



实验十五 双缩脲法测定蛋白质含量

一、原理

具有两个或两个以上肽键的化合物都具有双缩脲反应。在碱性溶液中双缩脲与铜离子结合形成复杂的紫红色复合物。而蛋白质及多肽的肽键与双缩脲的结构类似,也能与铜离子在碱性环境中形成紫红色复合物,其最大光吸收在 540nm。其颜色深浅与蛋白质浓度成正比,而与蛋白质的分子量及氨基酸组成无关,该法测定范围适于 1~10mg 蛋白质/ml 溶液。



双缩脲法常用于蛋白质的快速测定,低浓度的铵盐不干扰结果,Tris 及含氨基酸、多肽的缓冲液,以及蔗糖、甘油等干扰本实验。

二、试剂

标准蛋白质溶液: 10.0mg/ml 的牛血清白蛋白溶液或

2.0mg/ml 的酪蛋白溶液(用 0.05mol/L NaOH 溶液配制,可加热或放置过夜助溶)。标准蛋白液最好用微量凯氏定氮法测定其蛋白质含量,确定纯度。

待测样品液:可选用血清样品(稀释 10 倍),注意使其浓度在标准曲线测试范围内。

双缩脲试剂:取 1.5g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 6.0g 酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)溶于 500ml 蒸馏水中,搅拌加入 300ml 的 10%NaOH 液(可另加 1gKI 以防止 Cu^{2+} 自动还原成一价氧化亚铜沉淀),用水释至 1000ml。此试剂可长期保存,若有黑色沉淀产生需重配。

三、操作方法

1. 标准曲线的制作:取 7 支试管编号,按下表操作:

编号	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白液(ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
蒸馏水(ml)	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
双缩脲试剂(ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

充分混匀后,室温($20 \sim 25^\circ\text{C}$)下放置 15 分钟。

A_{540}

以 A_{540} 为纵坐标,蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。

2. 样品测定:

	0	1	2
样品液(ml)	0	0.5	0.6
H_2O (ml)	0.6	0.1	0.0
双缩脲试剂(ml)	2.0	2.0	2.0

混匀后,室温下放置 15 分钟。

A_{540}

3. 计算:

$$\text{血清样品蛋白质含量(g/100 血清)} = \frac{N \times Y}{V} \times 10^{-3} \times 100$$

$$\text{固体样品蛋白质含量(\%)} = \frac{Y \times N}{C} \times 100\%$$

式中:Y 为标准曲线查得蛋白质浓度(mg/ml),N 为稀释倍数,V 为血清样品所取的体积(ml),C 为样品原浓度(mg/ml)。

四、注意事项

1. 须在显色后 30 分钟内比色,且时间应使各管尽量一致。30 分钟后可有雾状沉淀产生。

2. 有大量脂肪性物质存在时,可用乙醇或石油醚使溶液澄清后离心,用清液测定。

实验十六 福林-酚法测定蛋白质含量

一、原理

福林-酚试剂(Folin-phenol reagent)的显色原理是:首先在碱性条件下蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜复合物,该复合物随之将磷钼酸-磷钨酸还原成蓝色复合物。在一定条件下,蓝色强度与蛋白质质量成正比,范围约在 $25\sim 250\mu\text{g/ml}$ 蛋白质浓度。

虽然该法是测定蛋白质浓度应用最广泛的方法之一,但其缺点也很明显,专一性较差,干扰物质多(如 Tris 缓冲剂,蔗糖、硫酸铵、巯基化物、酚类、柠檬酸等),标准曲线的直线关系不特别严格。因此在其应用过程中有很多新的修正。

首先考查一下其基本方法。

二、实验内容

(一)Lowry 基本法

1. 试剂

试剂甲:(A) $10\text{g Na}_2\text{CO}_3$, 2g NaOH 和 0.5g 酒石酸钾钠(或钠盐或钾盐)溶于 500ml 蒸馏水。(B) $0.5\text{g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 蒸馏水。每次使用前将两溶液以 $A:B=50:1$ 混合,此为试剂甲。

试剂乙:在 1.5 升的磨口回流瓶中加入 100g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25g 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)及 700ml 蒸馏水,再加 50ml 85% 磷酸, 100ml 浓盐酸,充分混合,接上回流冷凝管以小火回流 10 小时。回流结束后加入 150g 硫酸锂, 50ml 蒸馏水及数滴液体溴,开口继续沸腾 15 分钟以便驱除过量的溴,冷却后溶液呈

黄色(如仍呈绿色,须再重复滴加液体溴的步骤)。将溶液稀释至 1 升,过滤,滤液置棕色瓶中保存。使用时用标准氢氧化钠滴定,以酚酞为指示剂,然后适当稀释(约加 1 倍水),使最终的酸浓度为 1mol/L。

标准蛋白质溶液,取结晶 BSA 溶于蒸馏水,浓度为 250 μ g/ml。

未知蛋白质溶液:取动物血清,使用前稀释 100 倍。

2. 操作方法

取试管编号按下列顺序加入各试剂

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蛋白质含量(μ g)	0	25	50	100	150	200	250	—	—
250 μ g/ml BSA(ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—	—
待测蛋白(ml)	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0
H ₂ O(ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	—	0.5	—
试剂甲	均加入 5ml 摇匀,室温下放置 10 分钟								
试剂乙(1mol/L)	均加入 0.5ml,立即混匀,室温放置 30 分钟后比色								

A_{650}

3. 计算

以光密度对蛋白质含量作图,然后利用未知样品的光密度值,求其蛋白质含量。

4. 说明

在原始文献中的试剂甲配方如下:① 20g Na₂CO₃ 溶于 0.1mol/L NaOH1000ml 中;② 0.5g 硫酸铜溶于 1%酒石酸钾钠中,使用前将按①:②=50:1(V/V)混和。酒石酸盐可用 1%柠檬酸三钠代替,更易于保存。

比色测定时的波长可选 650nm 或 660nm,若蛋白质浓度在 20~100 μ g,可选用 750nm(在 660nm 所读取的光密度为 750nm 时的 90%),若在 125 μ g 以上可采用 500nm。

下列浓度较低的物质对显色没有影响：尿素(0.5%左右)、胍(0.5%左右)、硫酸钠(1%)、硝酸钠(1%)、TCA(0.5%，中性)、乙醇(5%)、乙醚(5%)、丙酮(0.5%)，但浓度较高时要校正。若样品酸度较高，显色后色浅，则必须提高碳酸钠-NaOH 溶液的浓度 1~2 倍。

(二)Lowry 简易测定法

1. 试剂

试剂甲：碱性铜试剂中含 0.5mol/L NaOH, 10%碳酸钠, 0.1%酒石酸钾钠和 0.05%硫酸铜，配制时注意硫酸铜先用少量水溶解后并入。

试剂乙：与(一)中的配制相同，只是临用前稀释 8 倍。

2. 操作方法

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA 溶液(ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—	—
待测样品(ml)	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0
H ₂ O(ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	—	0.5	—
试剂甲	均为 1ml, 摇匀放置 10 分钟。								
试剂乙	均为 4ml, 立即剧烈摇动, 55°C 恒温水浴中加热 5 分钟, 用流动水冷却后比色。								

A₆₆₀

3. 结果

其结果处理方式与 I 中一样。

本方法是简化了试剂配制方法，缩短了测定时间。

(三)改良测定法

实际在蛋白质的测量时，反应体系有许多未知的干扰因素。诸如：酚类(除硝基酚)、甘氨酸(0.5%以上)、胍(0.005%以上)、硫酸铵(0.15%以上)、二硫丁四醇、β-巯基乙醇、谷胱甘肽、钾离子(12mmol 以上)、乙二胺四乙酸(EDTA)、青霉素、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、N-二(羟乙基)甘氨酸、乙酰丙酮、蔗糖、氨基葡萄糖、果

糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、山梨糖、TritonX-100, 甘氨酸、甘氨酸、柠檬酸盐、琥珀酸、乙烯、乙二醇、甘油、聚乙烯、吡咯烷酮和载体两性电解质等。它们或增强/减弱空白颜色, 或增强/减弱显色程度, 或还原破坏试剂乙或产生沉淀等等。为了更准确地测定蛋白质含量, 排除干扰物质的影响, 用蛋白质沉淀的手段来达到这些目的。即在具有脱氧胆酸钠的条件下, 用 6% 三氯乙酸可以定量地将蛋白质沉淀下来, 然后进行测定。

1. 试剂

试剂甲和试剂乙以及蛋白质样品均同(一)。

2% 脱氧胆酸钠: 用水溶解。

24% 三氯乙酸溶液: 用水配制。

2. 操作方法

以 BSA 为标准曲同(一)一样制作标准曲线。

待测蛋白质样品在试管中加 H_2O 至 9ml, 再加 2% 脱氧胆酸钠 0.075ml, 剧烈混和, 放置 15 分钟。加 24% 三氯乙酸 3ml, 混和后以 3500r/min 离心 30 分钟, 蛋白质沉淀于管底, 小心倾去上清液(其残留量不能超过 0.05ml)。加试剂甲 4.5ml, 剧烈混和, 蛋白质沉淀在 30 秒内溶解, 加 0.45ml 试剂乙, 迅速摇匀。放置 30 分钟后于 660nm 测光密度, 以不含蛋白质的水作空白对照。

3. 结果处理同(一)

4. 说明

有些物质一次沉淀难以去除, 如 Tris-HCl (0.03mol/L, 指上述方法中 9ml 反应体系内的浓度, 下同)、乙酰丙酮 (0.015%)、青霉素 (5 单位) + 链霉素 (5 μ g)、酚 (0.015%)。需进行第二次沉淀。其方法是将第一次沉淀再溶于 9ml 水中, 其余同前操作。

(四) Lowry 测定法各种因素的考查

1. 试剂

试剂甲: 内含 0.1% (W/V) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.2% (W/V) 酒石酸钾钠, 10% (W/V) Na_2CO_3 。先将 Na_2CO_3 溶于 450ml 水中, 再将

它慢慢加入到硫酸铜-酒石酸钾钠溶液(450ml)中,边加边搅拌。最后定容到 1000ml。该溶液在 10℃ 稳定,低温贮存时碳酸盐可能会析出。

试剂乙:Folin-酚试剂(2mol/L),配法见本实验。

5%(W/V)SDS

0.8mol/LNaOH

BSA,0.3mg/ml 水

溶菌酶,0.3mg/ml 水

未知蛋白液

3mol/L KCl

1mol/L Tris-HCl(pH7.5)

5%(W/V)Triton X-100

0.25mol/L 二硫苏糖醇。

2. 操作方法

①取试管编号

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.3mg/ml BSA(ml)	0	0.05		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	—	—	—	—
H ₂ O(ml)	1.0	0.95		0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	—	0.86	0.86	0.5	—
0.3mg/ml 溶菌酶(ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.14	0.14	—	—
未知蛋白液 (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	1.0
						16		17		18		19			
0.3mg/ml BSA(ml)						0.14		0.14		0.14		0.14			
H ₂ O(ml)						0.76		0.76		0.76		0.76			
3mol/L KCl(ml)						0.1		—		—		—			
5% Triton X-100(ml)						—		0.1		—		—			
0.25mol/L 二硫苏糖醇(ml)						—		—		—		0.1			
1 mol/L Tris-HCl(ml)						—		—		—		—		0.1	

依次进行②、③步处理。

②取 10ml 试剂甲与 20ml 5%SDS 液,10ml 0.8mol/L NaOH

液置于三角瓶中彻底混匀。向各试管加入此混和液 1ml, 室温保持 10 分钟。

③另取 10ml 的 2mol/L Folin-酚试剂与 50ml 水混匀。然后将此混合液加入到各试管中, 立即彻底摇匀。室温再放置 30 分钟。

于 540nm 下测定各管的光吸收值。对于含 0.2, 0.4 和 0.6ml BSA 的标准管进行可见光扫描(400~650nm), 作好记录。

3. 实验结果

以 A_{540} 为 y 轴, BSA 的含量(μg)为 x 轴作图。计算出蛋白质-Cu-磷钨酸-磷钼酸复合物的微摩尔消光系数。

根据标准曲线查出溶菌酶的浓度, 并与预想值比较, 有何不同?

计算出未知蛋白样品的浓度。

解释 KCl、Triton X-100、二硫苏糖醇和 Tris-HCl 对各管的影响。

实验十七 紫外吸收法测定 蛋白质浓度

一、原理

蛋白质分子中所含的酪氨酸和色氨酸残基使蛋白质在 280nm 下具有最大吸收值。这是因为两种氨基酸残基的苯环中含有共轭双键,在一定的浓度范围内,蛋白质溶液的 280nm 光吸收值与其浓度成正比;范围是 0.1~1.0mg 蛋白质/ml 溶液,因此可用作定量测定。

但不同蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量不同,所处的微环境也不同,因此不同的蛋白质溶液在 280nm 的光吸收值也不同,但区别不十分明显。据统计,浓度为 1mg/ml 的 1800 种蛋白质溶液在 280nm 处的光吸收值在 0.3~3.0 之间,平均为 1.25 ± 0.51 。

蛋白质的肽键在 200~250nm 有强的紫外吸收,其光吸收强度与一定范围的蛋白质浓度成正比,且波长越短光吸收越强,若选用 215nm 可减少干扰及光散射,用 215nm 和 225nm 光吸收差值与单一波长测定相比可减少非蛋白质成分引起的误差。

紫外吸收法操作简便快捷,不消耗样品,低浓度的盐类不干扰测定,在生化研究中应用广泛,尤其是适合于柱层析分离中蛋白质洗脱情况的检测。但也有相当的物质对紫外法有干扰,如核酸等。

二、实验内容

(一)280nm 的光吸收法

本法适用于一般的半定量测定,也可用于纯蛋白质的定量测定。

1. 操作方法

取 3ml 蛋白质样品,以相应的缓冲液作对照,选用 1cm 光径的石英比色杯,在 280nm 测光吸收值。

通常以蛋白质浓度为 1mg/ml 的 $A_{280}=1.0$ 作为根据估算待测液中的蛋白质浓度。若已知该蛋白质的文献值,可直接计算出待测样品中蛋白质的浓度。

2. 注意事项

蛋白质的紫外吸收峰常因 pH 值的改变而有变化,故测定时应注意 pH 值的控制。

当然,也可以先做一标准曲线再求未知样中的蛋白质浓度。蛋白质范围应在 0.1~1.0mg/ml。

(二)280nm 和 260nm 的吸收差法

核酸、核苷酸、碱基等物质在紫外区也有强吸收,且这些物质在生物材料中含量丰富,常与蛋白质类相互干扰。但二者的紫外吸收特性不一样,核酸类物质在 260nm 的光吸收比 280nm 更强,而蛋白质正相反,因此可利用 280nm 和 260nm 的吸收差来计算蛋白质浓度,其经验公式是:

$$\text{蛋白质浓度 (mg/ml)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

(假设 1mg 蛋白质/ml 溶液的 $A_{280}=1.0$)

方法是直接取蛋白质样品,以相应的溶剂作空白对照,分别于 260nm 和 280nm 读光吸收值,依据上述经验公式即可求出待测蛋白质样品的浓度。

(三)215nm 和 225nm 的吸收差法

稀溶液中的蛋白质浓度适合于本测定法。适用范围是 20~100 μ g 蛋白质/ml 溶液,其经验公式:蛋白质浓度 (mg/ml) = $0.144(A_{215} - A_{225})$

方法是直接取蛋白质样品溶液,按与(二)类似的手段分别读

出其 A_{215} 和 A_{225} , 即可求出蛋白质样品中的浓度。

或者用一已知浓度的蛋白质, 建立一系列不同浓度的溶液, 分别读其 A_{215} 和 A_{225} , 然后以吸收差 ($\Delta = D_{215} - D_{225}$) 为纵坐标, 蛋白质浓度为横坐标制作标准曲线。同样未知样品在测得吸收值以后, 可直接从标准曲线上查得其浓度。

本法灵敏度高, 且无蛋白质特异性。NaCl、硫酸铵、0.1mol/L 磷酸、硼酸和 Tris 等均无显著干扰。但 0.1mol/L NaOH, 0.1mol/L 乙酸、琥珀酸、柠檬酸、邻苯二甲酸、巴比妥等在 215nm 的光吸收较大, 必须降低其浓度在 5mmol/L 以下才无显著影响。

实验十八 考马斯亮蓝 G-250 染色法 测定蛋白质含量

一、原理

蛋白质的存在影响酸碱滴定中所用某些指示剂的颜色变化,从而改变这些染料的光吸收。在此基础上发展了蛋白质染色测定方法。涉及的指示剂有甲基橙、考马斯亮蓝、溴甲酚绿和溴甲酚紫。目前广泛使用的染料是考马斯亮蓝。

考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色,当它与蛋白质通过范德华键结合后,变为蓝色,且在蛋白质一定浓度范围内符合比尔定律,可在 595nm 处比色测定。2~5 分钟即呈最大光吸收,至少稳定 1 小时。在 0.01~1.0mg 蛋白质/ml 范围内均可。该法操作简便迅速,消耗样品量少,但不同蛋白质之间差异大,且标准曲线线性差。高浓度的 Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵和去污剂对测定有干扰。缓冲液浓度过高时,改变测定液 pH 值会影响显色。考马斯亮蓝染色能力强,比色杯不洗干净会影响光吸收值,不可用石英杯测定。

二、试剂

1. 染色液:取考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50ml 95%乙醇中,加 100ml 85%磷酸,加水稀释至 1 升。该染色液可保存数月,若不加水可长期保存,用前稀释。

2. 标准蛋白溶液:0.5mg/ml 牛血清白蛋白。

三、操作方法

取 11 支试管 ($16 \times 150\text{mm}$) 编号, 依次分别加入 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50ml 标准蛋白溶液, 用水补足到 0.50ml, 加 3ml 染色液, 立即摇匀, 置室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) 放置 15 分钟。然后于 595nm 波长处比色, 另取 0.5ml 未知浓度的蛋白溶液同上测定, 从其 $A_{595\text{nm}}$ 值推算出其浓度大小。

注意因标准曲线的线性较差, 及时校正, 同时显色受时间与温度影响较大, 控制在同一条件下操作。

四、结果处理

以 A_{595} 为 y 轴, 牛血清白蛋白含量为 x 轴画出标准曲线, 然后在标准曲线上查出未知样品的浓度。同样用 Lowry 法测定, 比较二者结果有何差异?

实验十九 氨基酸的分离鉴定 ——纸层析法

一、原理

纸层析法(paper chromatography)是最简单的液-液相分配层析,它以滤纸作惰性支持物,其原理主要是分配作用,辅以吸附和离子交换作用。滤纸纤维上的羟基具有亲水性,当支持物被水饱和时,滤纸及被吸附的水作为层析的固定相,与固定相不相混溶的有机相为层析的流动相。如果有多种物质存在于固定相和流动相之间,将随着流动相的移动进行连续和动态的不断分配。由于各物质分配系数的差异,移动速度就不一样,按照相似溶解相似规律,分配系数大者在纸上移动速度慢,反之则快。最后不同的组分可以彼此分开。

物质分离后在图谱上的位置可用比移值 R_f 表示:

$$R_f = \frac{\text{展层后斑点中心与原点之间的距离}}{\text{溶剂前沿与原点之间的距离}}$$

对某些特定化合物在特定的展层系统在一定的温度下, R_f 是个常数, R_f 值与分配系数 α 有如下关系:

$$\alpha = \frac{A_f}{A_s} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

式中 A_f 和 A_s 分别表示流动相和固定相体积, R_f 取决于被分离物质在两相间的分配系数和两相间的体积比。由于两相体积比在同一实验条件下是一常数,所以 R_f 主要取决于分配系数。不同的物质分配系数不同,也就有不同的 R_f 。此外溶剂和溶质的性质、滤纸

的性质、展层的温度和 pH 值均影响 R_f 值。

展层的方式根据溶剂在纸上扩展的方向可分为上行法、下行法和环形法。上行法是让溶剂自下而上渗透的展层方式,最常用。下行法是让溶剂由纸的上端向下渗透的展层方式,其渗透速度快,展开距离可很长,有利于分离 R_f 值相差较小的组分。环形法则稍复杂,它是在圆形滤纸上进行层析,从边缘至圆心剪下一条宽 2~3mm 的纸条,裁成合适长度使其浸入盛有溶剂的培养皿中,样品可点于圆心,溶剂从圆心向四周扩散,物质则在一定距离的半径上形成同心圆。同时展层的方式又有单向和双向之分。

展层形成的图谱对无色物质来说有以下几种显色方法:①化学法,常用喷雾方式将合适的显色剂均匀喷于纸上,使之与待分析组分起反应形成有色或荧光物质,如本实验的茚三酮显色法;②物理法,利用某些物质能吸收紫外线的性质,将其置于紫外灯下观察或产生暗斑,或产生荧光;③微生物法,利用有些化合物对某种微生物的生长抑制作用来鉴定其存在与否;④同位素及放射自显影方法。

二、试剂

谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸和丙氨酸混合液,将各氨基酸分别配成 $8 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 的浓度,然后混合之。

$8 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 谷氨酸和 $8 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 天冬氨酸混合液。

0.5% 的茚三酮丙酮溶液。

正丁醇、95%乙醇、88%甲酸、12%氨水。

三、操作方法

1. 点样:选用新华 1 号滤纸,剪成 $18 \times 18 \text{cm}$ 的正方形,在距相邻两边各 2.0cm 处用铅笔轻轻划两条线,在线的交叉点处点样。已知氨基酸混合液用量以 30~40 μl 为宜,斑点扩散直径不大于 0.5cm,点样时操作应小心,不能把滤纸弄破。点样中若点一次

后须点第二次,可用电吹风冷风吹干。

2. 展层:将点好样的滤纸两侧边缘对齐,用线缝好,卷成筒形。注意缝线处的滤纸两边不能接触,以免由于毛细管现象使溶剂沿两边移动太快而造成溶剂前沿不齐。将圆筒状滤纸放入平皿中,注意滤纸勿与皿壁接触,皿周围放3个小烧杯,内盛平衡溶剂,盖好钟罩进行平衡。1小时后打开钟罩上端塞子,将加溶剂漏斗插入罩内,使其下端至平皿底部,通过漏斗加入层析溶剂(正丁醇:12%氨水:95%乙醇=13:3:3),取出漏斗时勿碰到滤纸。当溶剂展层至距纸上沿约1cm时取出滤纸,作好前沿位置标记后晾干,将纸转90°,再次缝好后用第二相展层剂展层(正丁醇:80%甲酸:水=15:3:2体积比)。

第一相展层时用12%氨水作平衡溶剂,第二相展层时,用该相溶剂平衡。展层剂易挥发,需新鲜配制,注意摇匀,每相用量18~20ml。

3. 鉴定:将层析好的滤纸用吹风机吹干后再用0.5%茚三酮丙酮溶液在纸上均匀喷雾,待自然晾干后置65°C烘箱内烘30分钟,取出后用铅笔轻轻描出各显色斑点的形状。用直尺量出各斑点中心与原点的距离以及溶剂前沿与原点的距离,求出各氨基酸的 R_f 值。将各显色斑点的 R_f 值与标准氨基酸的 R_f 值比较,可得知该斑点的准确成分。

整个实验操作应带手套进行。

四、注意事项

1. 选用合适、洁净的层析滤纸。滤纸应质地均匀厚薄一致,具有一定的机械程度和一定的纯净度,若分离样品可用厚滤纸,Whatman No. 1 滤纸与国产新华一号滤纸相似。不洁净的滤纸可浸于0.4mol/L HCl 中20小时,蒸馏水洗至中性,再依次用95%乙醇、无水乙醇和无水乙醚各浸洗一次,吹风机吹去乙醚,40°C烘干,但处理后的滤纸脆性增加。

2. 茛三酮的重结晶。5g 茛三酮溶于 15ml 热水,加入 0.25g 活性炭轻轻搅动,加热 30 分钟后趁热过滤(用热滤漏斗,茛三酮遇冷结晶),滤液置冰箱中过夜,次日黄白色结晶出现,再过滤,用 1ml 冷水洗涤结晶,置干燥器中干燥后置棕色瓶内保存。

3. 进行双相层析时,经第 I 相展层后,上端未经溶剂走过的滤纸与已被溶剂走过的滤纸形成一分界线,在第 II 相展层时在分界线上影响斑点形状,因此在进行 II 相展层前,先将第 I 相上端的 2cm 边剪去,注意记下第 I 相时的原点与溶剂前沿距离。

4. 纸层析的定量可用洗脱比色法。层析滤纸显色后按照同样大小的面积将各显色斑点剪下,在同一张滤纸上剪一块大小相仿的空白纸作比色对照用。各纸斑剪成细条梳状后装入干燥试管内,加 5ml 0.1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 75%乙醇 = 2 : 38(V/V)的溶液洗脱。间歇振荡,洗脱液呈粉红色,10 分钟后在 520nm 波长处进行比色测定,所得比色读数在标准曲线上查出其含量。

5. 标准曲线的绘制:配制已知浓度的 Glu 和 Asp 混合液,用单相层析法,在滤纸底边 2.5cm 处分别点 5,10,15 和 20 μl 氨基酸混合液,每点间隔 2.5cm,留一空白点位置作对照。用正丁醇 : 80%甲酸 : 水 = 15 : 3 : 2(V/V/V)溶剂系统展层。同本实验中的步骤显色、洗脱和比色,以氨基酸含量为横坐标,光吸收值为纵坐标作图。结果应为一直线,不同氨基酸其斜率不同。

实验二十 从牛奶中分离酪蛋白

一、原理

酪蛋白是牛奶的主要蛋白,其浓度约在 3.5g/100ml 牛奶左右。实际上酪蛋白是一类含磷蛋白质的复杂混合物,而不是单一的化合物。

酪蛋白的等电点大约在 4.8,且不溶于乙醇。利用这两点性质将酪蛋白与其它蛋白质分开,并除去不必要的脂质。

二、试剂

0.2mol/L 乙酸钠缓冲液, pH4.6。牛乳、乙醇-乙醚(V/V1 : 1)。

三、操作方法

取牛乳 100ml 置 500ml 烧杯中,加热到 40°C,边搅拌边慢慢加入 100ml 预热的(40°C)醋酸缓冲液,直到 pH 达到 4.8 左右,可用酸度计检验并调节之。将悬液冷却到室温,静止 5 分钟后用纱布过滤,收集沉淀。

用少量水将沉淀洗涤几次,再悬浮于 30ml 乙醇中,用布氏漏斗滤去乙醇溶液,再倒入乙醇-乙醚混合液洗涤两次,最后用乙醚洗涤沉淀两次,抽干。将沉淀铺在表面皿上除去乙醚,称重。此即干燥的酪蛋白纯品。

四、计算

算出每百毫升牛乳中酪蛋白数量(%)。若以 3.5% 为理论产量, 算出回收率(%)。

实验二十一 α -乳清蛋白的分离和纯化

一、原理

α -乳清蛋白(又称 α -乳白蛋白)最早于 1899 年从牛乳中分离出来。该蛋白的分子量为 15500, 该蛋白由 129 个氨基酸残基组成, 在牛乳中的含量高达 1mg/ml。它是乳糖合成酶系统的必需成分。

在牛乳中的主要蛋白是酪蛋白, 它经酸沉淀(pH4.6)或热处理和硫酸钠处理后从牛乳中去除(可参见“从牛奶中分离酪蛋白”一实验)。而 α -乳清蛋白经过这些处理后仍以溶液态存在, α -乳清蛋白的分离纯化流程见下图。在第一步中酪蛋白被沉淀下来, 而 α -乳清蛋白和其它蛋白仍保留在上清液中。由于 α -乳清蛋白在低于 pH4 的酸性环境中不溶解, 因此通过 HCl 的加入可使该蛋白沉淀出来(此为第二步); 当 pH 在 6.0 以上时, α -乳清蛋白又变成可溶的, 第三步就是利用此特性从沉淀中再次将它提取出来; 然后在第四步中再次将碱溶性蛋白用酸沉淀; 第五步用 Sephadex 凝胶柱层析将其纯化。

因为 α -乳清蛋白没有独特的物理、化学或生物学特征, 故没有快速的检测方法在纯化过程中可利用。我们可利用蛋白质所共有的紫外吸收特征进行快速跟踪检测, 这是指所有的蛋白质而不是 α -乳清蛋白。关于 α -乳清蛋白的专一性分析方法需利用乳糖合成酶系统进行偶联分析, 有专门的实验介绍。

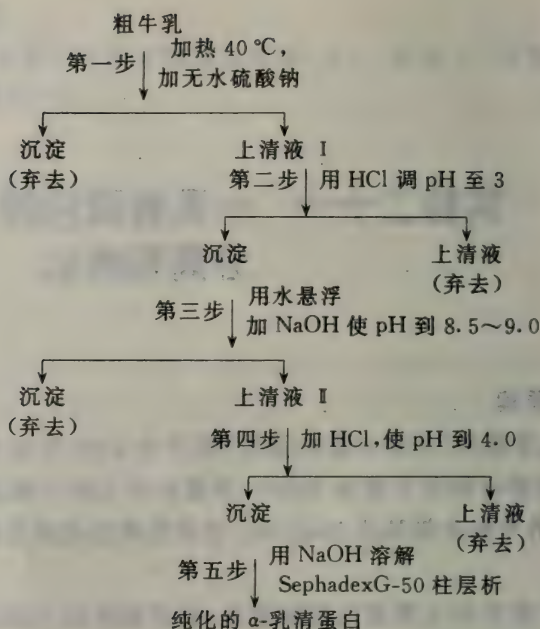


图:从牛乳中分离 α -乳清蛋白的流程图

二、试剂

新鲜牛奶 100ml、无水硫酸钠 20g、浓盐酸和 1mol/L HCl、1mol/L NaOH、0.05mol/L 碳酸氢铵溶液。

Sephadex G-50, 用 0.05mol/L 碳酸氢铵液处理。

三、操作方法

1. 将 100ml 牛奶倒入 1 升的烧杯中加热到 40℃, 边加热边搅拌, 然后向其中加入 20g 无水硫酸钠, 缓慢加入, 边加边搅, 大约需 10~15 分钟。加毕后放置 10 分钟, 再用尼龙布过滤, 弃去沉渣, 滤液待用。

2. 将滤液置于 1 升烧杯中温和搅拌, 用浓盐酸调其 pH 值为 3 ± 0.1 (用 pH 计测量)。然后于 $10000 \times g$ 离心 15 分钟, 弃去上

清,沉淀备用。

3. 用 10ml 蒸馏水悬浮 2 步中的沉淀,然后滴加 1mol/L NaOH 调 pH8.5~9.0(用 pH 试纸),充分混匀,勿摇!大部分蛋白质溶解,再于 $12000\times g$ 离心 10 分钟,将上清转移到 50ml 烧杯中待用。

4. 用 1mol/L HCl 调该液的 pH 值为 4.0(用 pH 计)边滴加边搅匀,于 $12000\times g$ 离心 10 分钟,弃去上清液,沉淀备用。

5. 沉淀用少量 0.05mol/L 碳酸氢铵溶液悬浮待用,也可冰冻贮存备用。

将处理好的 Sephadex G-50 装柱(2.5cm \times 40cm)使柱床高约 30cm,然后用 0.05mol/L 碳酸氢铵充分平衡。待分离纯化的乳清蛋白粗样品(浓度约 5mg/ml)2ml 加到层析柱上进行纯化,洗脱液仍为 0.05mol/L 碳酸氢铵溶液,流速为 10~15ml/小时,每 5ml 收集一管。用 280nm 处的光吸收值监测洗脱进程,用 0.05mol/L 碳酸氢铵液做比色空白,记录下每管的 A_{280} 值。收集 $A_{280}>0.2$ 的部分并合并之,用于进一步的实验,使用过的 Sephadex G-50 可回收再用。

四、结果分析与思考题

以 A_{280nm} 对试管编号作图可得一洗脱曲线图。分析图中有几个蛋白峰?何者含蛋白质量最多?你认为每个峰中只含有一种蛋白质呢或是几种蛋白质的混合物?

实验二十二 α -乳清蛋白的分析鉴定

一、原理

在 α -乳清蛋白的分离纯化实验中所提供的检测(280nm 下测光吸收)只是表明各分离步骤中有蛋白质的存在,但至于有多大的含量,有几种蛋白质存在,何种蛋白质数量占优势等问题均没有得到解答。在本实验中我们提供了两种测定总蛋白质含量的方法,用PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)法来鉴定终产物的纯度。有关这几种方法的原理在前述有关实验中已经作过说明,此不赘述。

二、试剂

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

α -乳清蛋白样品(包括标准品和前一个实验中制备的 α -乳清蛋白)

贮存液:

- a. Tris-甘氨酸缓冲液, pH8.3。
- b. 含 TEMED 的 Tris 缓冲液, pH8.9。
- c. 28% 丙烯酰胺和 0.74% 双体丙烯酰胺溶液。
- d. 含 TEMED 的 Tris 缓冲液, pH6.9。
- e. 10% 丙烯酰胺和 2.5% 双体丙烯酰胺溶液。
- f. 核黄素, 40mg/L, 用水配制。
- g. 过硫酸铵(0.14%), 用水新鲜配制。
- h. 蔗糖, 400g/L, 用水配制。
- i. 0.02% 溴酚蓝指示剂。

考马斯亮蓝染色系统:

a. 染色液, 0.25% 考马斯亮蓝液, 溶剂为甲醇: 乙酸: 水 = 5: 1: 5。

b. 脱色液, 醋酸: 甲醇: 水 = 7: 7: 86。

银染系统:

a. 预固定液 1, 甲醇: H_2O : 醋酸 = 50: 40: 10。

b. 预固定液 2, 水: 醋酸: 甲醇 = 88: 7: 5。

c. 10% 戊二醛的固定液; 0.1% 硝酸银水溶液; 二硫苏糖醇溶液 ($5\mu g/ml$); 柠檬酸 ($2.3mol/L$)。

d. 染液, $500\mu l$ 的 3.7% 甲醛溶于 1 升 3% 碳酸钠液。

2. 蛋白质分析方法 (Lowry 法)

前一实验中纯化得到的 α -乳清蛋白。

0.1mg/ml 的小牛血清白蛋白溶液。

溶液 a: 1% $CuSO_4$ 。

溶液 b: 2% Na_2CO_3 , 用 0.1mol/L NaOH 溶解。

溶液 c: 2% 酒石酸钠。

溶液 d: Folin 试剂 ($2mol/L$)。

考马斯亮蓝法, 见实验十八。

三、操作方法

1. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 胶的制备

按下述配方准备工作液

① 分离胶: 1ml 溶液 b, 2ml 溶液 c 和 1ml H_2O 。

② 浓缩胶: 1ml 溶液 d, 2ml 溶液 e, 1ml 溶液 f 和 4ml 溶液 h。

每个待分析蛋白质样品准备 2 支玻管 (6mm 内径 \times 7.5cm 高), 用 parafilm 膜或橡胶管封住玻管的一端后将其竖直放好。取 4ml 分离胶 (①液) 和 4ml 过硫酸铵 (即溶液 g), 充分混匀并立即转移到玻璃管中, 最后用 1 滴水将胶液面上端与空气隔开, 使胶进

行聚合反应,约需 30 分钟。

在聚合过程进行的同时,准备工作液 2(即浓缩胶液),聚合完毕后,将分离胶上层的水小心吸去,然后在分离胶顶端加工作液②,同上再用水封闭,再置于光线充足的地方使之充分聚合,时间约需 30 分钟,最后吸去水层。

去掉玻管一端的封口膜或橡胶管,做好标记,将其插入到电泳槽的合适位置,浓缩胶向上方。向电泳槽的上下池中加入适量的 Tris-甘氨酸电极缓冲液,赶尽玻管中的气泡。

(2)加样

每个蛋白质样品取 2 份(0.1ml 和 0.2ml),各与 0.1ml 蔗糖液混和,再各加 0.1ml 溴酚蓝指示剂溶液,即为蛋白质电泳样液。然后用长滴管将 0.1ml 蛋白质电泳样液转移到玻管的上端,每管一个样品。

(3)电泳

检查电泳装置,确认无误后即可开始电泳,设定 5mA/管。当溴酚蓝到达下端约 1 厘米处(约需 1~2 小时)时,关闭电源,打开电泳槽,取出玻管。

(4)剥胶

注射器吸入水后将针头小心插入玻管管壁和胶之间的位置,边转动玻管边注水,推出来的胶用培养皿或带盖试管盛放。

(5)考马斯亮蓝法染色

向盛有胶的器皿中倒入足量的考马斯亮蓝染色液,使之淹没凝胶,放置 30 分钟后倒出染色液换以脱色液,每隔几小时再换以新的脱色液,直到胶本底无色而只有蛋白带显色为止,此过程需花几天时间。

(6)银染法

将胶条用预染液 1 浸泡 30 分钟,然后用预染液 2 浸泡 30 分钟以固定,再用 10%戊二醛固定 30 分钟,以防止蛋白质的移动和扩散。用蒸馏水冲洗凝胶,接着用二硫苏糖醇溶液浸泡 30 分钟。将

其倾去后再用 0.1% 硝酸银溶液泡 30 分钟,用蒸馏水洗一次,甲醛液洗二次,再泡于甲醛溶液中直到蛋白带明显可见为止。最后用 2.3mol/L 柠檬酸液 5ml 终止染色过程,用水冲洗几遍凝胶即可。

(7) 结果处理

量出每条胶的总长度,每个蛋白带和染料自上端向下移动的距离,并画出每条凝胶的示意图。

2. 蛋白质分析

(1) Lowry 法

准备 10 支试管(10mm×100mm),按下表加各种试剂,其中 1 号管作空白,2~6 号管为标准曲线制作,7~10 号管为两种不同浓度的待测 α -乳清蛋白管(各两份),注意在每支试管加 CuSO_4 之前均为 1.0ml。

试剂	管号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{H}_2\text{O}(\text{ml})$	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0.7	0.7	0.4	0.4
标准 BSA(ml)	—	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	—	—	—	—
α -乳清蛋白(ml)	—	—	—	—	—	—	0.3	0.3	0.6	0.6
碱性 CuSO_4	均为 5.0ml									

混匀,放置 10 分钟

Folin 试剂 均为 0.25ml

混匀,放置 30 分钟

A_{540}

其中的碱性 CuSO_4 工作液需按下述程序新鲜配制:取 1.0ml 溶液 c(酒石酸钠液)转移到 125ml 容量瓶中,再加 1.0ml 溶液 a(CuSO_4 液)和 98ml 溶液 b(Na_2CO_3 液),边加边搅拌,混匀后的溶液可用 1 天。

(2)Bradford 法(考马斯亮蓝染色法)

准备 10 支试管(10mm×100mm),按下表顺序加各种试剂

试剂	管号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ₂ O(ml)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0.7	0.7	0.4	0.4
标准 BSA(ml)	—	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	—	—	—	—
α-乳清蛋白(ml)	—	—	—	—	—	—	0.3	0.3	0.6	0.6
Bradford 试剂	均加 5ml,彻底混匀,放置 5 分钟。									

A₅₉₅

(3)紫外法

按操作规程打开紫外分光光度计,预热 15 分钟,将波长调至 260nm,以 0.05mol/L 碳酸氢铵作空白调零点,然后读出 α-乳清蛋白的光吸收值(A₂₆₀)。若该值大于 1.0,请用碳酸氢铵作溶剂稀释后再读 A₂₆₀。

同上述步骤一样,将波长分别调至 280nm 和 290nm,读 α-乳清蛋白的 A₂₈₀和 A₂₉₀。

若条件许可,可获得波长在 240nm 到 340nm 范围内的 α-乳清蛋白连续光谱,同样以碳酸氢铵作空白,同样作一个标准 α-乳清蛋白的紫外光谱图。将二者进行比较。

四、结果分析

1. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳

仔细观察胶条并估计每个蛋白样品的蛋白质组成数目。计算每条蛋白带的相对迁移率。

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{蛋白质泳动距离}}{\text{指示剂染料的泳动距离}}$$

将每个胶条中的所有谱带的相对迁移率列表,比较你自己纯化的 α-乳清蛋白和标准乳清蛋白的电泳结果。你从牛奶中获得的主要

蛋白质是不是 α -乳清蛋白?

2. 蛋白质分析

从小牛血清白蛋白的数据制作一标准曲线,以光吸收值为纵坐标,以标准蛋白毫升数为横坐标,进而根据 α -乳清蛋白的光吸收值计算出在分离峰中的浓度(mg/ml)。

3. 关于紫外吸收法的说明

因为具有紫外吸收的干扰物质很多,其中主要是核酸类,因此蛋白质含量与紫外吸收值之间的关系常常依于一些经验值。

紫外吸收法的蛋白质计算法

A_{280}/A_{260}	%核酸	F
1.75	0.00	1.12
1.63	0.25	1.08
1.52	0.50	1.05
1.40	0.75	1.02
1.36	1.00	0.99
1.30	1.25	0.97
1.25	1.50	0.94
1.16	2.00	0.90
1.09	2.50	0.85
1.03	3.00	0.81
0.95	3.50	0.78
0.94	4.00	0.74
0.87	5.00	0.68
0.85	5.55	0.66
0.82	6.00	0.63
0.80	6.50	0.61
0.78	7.00	0.59
0.77	7.50	0.57
0.75	8.00	0.55
0.73	9.00	0.51
0.71	10.00	0.48
0.67	12.00	0.42
0.64	14.00	0.38
0.62	17.00	0.32
0.60	20.00	0.28

计算出 A_{280}/A_{260} , 用上表可查出对应的 F 值, 进而可知在收集峰中核酸的百分含量, 并计算出蛋白浓度(可根据下列公式):

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml}) = A_{280} \cdot F$$

$$\text{或蛋白质浓度}(\text{mg/ml}) = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

比较这两种方法的结果。

利用 Beer-Lambert 关系可计算 280nm 下的消光系数 $E^{1\%}$ 。

$$A = Ebc$$

式中 A : 280nm 下的光吸收值

E : 消光系数, $E^{1\%}$

b : 光径(通常为 1cm)

c : 蛋白质浓度(mg/ml)

纯的小牛 α -乳清蛋白之 $E_{280}^{1\%} = 20.1$ 。计算 A_{280}/A_{290} , 其标准值文献报导为 1.30。

实验二十三 微白蛋白的提取和纯化

一、原理

1. 离子交换层析法:离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)是分离、纯化混合物的液-固相层析方法。它基于被分离物质的阳或阴离子和相对应的离子交换剂间的静电结合,即根据物质的酸碱性、极性 etc 差异,通过离子间的吸附和脱吸附而将混合物的各组分彼此分开。其交换机制主要由 5 步组成:①离子扩散到树脂的表面,在均匀溶液中此过程非常迅速;②离子通过树脂扩散到交换位置,此过程是控制整个离子交换反应的关键,由树脂的交联度和溶液浓度所决定;③在交换位置上进行离子交换,它是瞬间发生的,且是一个平衡过程;④被交换的离子通过树脂扩散到表面;⑤用洗脱液洗脱,被交换的离子扩散到外部溶液中。离子交换层析包括离子交换剂平衡,样品物质的加入和结合,改变条件以产生选择性吸附、取代、洗脱和离子交换剂再生等步骤。样品加入后用起始缓冲液将未结合的物质从交换剂上洗掉;因为电荷不同的物质对离子交换剂有不同的亲和力,通过改变洗脱液的离子强度和 pH 值,使这些物质按亲和力大小顺序依次从柱中洗脱下来。整个交换过程是可逆的,一般遵循化学平衡规律。

离子交换剂据其基质的组成和性质可分为疏水性离子交换剂和亲水性离子交换剂两大类。前者中如由苯乙烯和二乙烯合成的聚合物——树脂。后一类有纤维素离子交换剂,交联葡聚糖离子交换剂和琼脂糖离子交换剂等。若按电荷基团的性质可分为阴离子交换剂和阳离子交换剂。

离子交换剂

名称	功能基团	基质	分类
阴离子交换剂			
AG1	季铵基	聚苯乙烯	强
AG3	叔胺基	聚苯乙烯	弱
DEAE-纤维素	二乙基氨基乙基	纤维素	弱
PEI-纤维素	聚乙烯亚胺基	纤维素	弱
DEAE-Sephadex	二乙基氨基乙基	葡聚糖	弱
QAE-Sephadex	二乙基(乙-羟丙基)乙基	葡聚糖	强
阳离子交换剂			
AG 50	磺酸基	聚苯乙烯	强
Bio-Rex 70	羧酸基	丙烯酸	弱
CM-纤维素	羧甲基	纤维素	弱
P-纤维素	磷酸基	纤维素	中
CM-Sephadex	羧甲基	葡聚糖	弱
SP-Sephadex	磺丙基	葡聚糖	强

选择何种离子交换剂,首先考虑能否保持被分离的大分子物质的生物活性和可溶性的pH值,然后确定在该pH值下目的物带何种电荷及其电性的强弱、分子的大小与数量,同时也要考虑环境中共存的其它组分带何种电荷、数量多少、与目的物差异大小等。在此基础上再考虑选择离子交换剂的类型、交换和洗脱条件等。

分离高分子生物活性物质时通常用纤维素离子交换剂和葡聚糖凝胶离子交换剂。它们的母体具亲水性,对生物大分子的吸附及洗脱都比较温和,而不破坏被分离物质。

2. 微白蛋白(parvalbumin):微白蛋白是一种球状钙结合蛋白,其分子特征为:由一条多肽链组成,分子量小(10000~12000),等电点低,在水中溶解性高,稳定性能好,具有特别的紫外吸收光谱。它在 Ca^{2+} 的信使作用中具调节功能。根据其分子特征我们用

Sephadex G-75 和 DEAE-Cellulose 来纯化它。在 pH6.5 的情况下,微白蛋白带有负电荷,因此选择 DEAE-纤维素离子交换剂。

二、试剂

抽提缓冲液: 10mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH6.5, 内含 1mmol/L CaCl_2 。

0.5mol/L HCl, 0.5mol/L NaOH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

三、操作方法

1. 微白蛋白的提取与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀: 取活鲫鱼背部肌肉 50g, 去皮后剪碎, 加 1.5 倍体积的抽提缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 内含 1 mmol/L CaCl_2), 置高速组织捣碎器中破细胞, 匀浆物可用镜检看细胞是否大部分已破碎, 然后用纱布过滤。滤液于 $15000\times g$, 4°C 离心 30 分钟, 取上清液, 量出体积后按 (W/V) 加固体硫酸铵至 55% 饱和度, 4°C 搅拌 1 小时后于 $18000\times g$, 4°C 离心 30 分钟, 取上清对抽提缓冲液透析至无 SO_4^{2-} 为止, 中间需经常更换缓冲液, SO_4^{2-} 可用 BaCl_2 溶液检查。最后用聚乙二醇 (MW=20000) 浓缩, 置冰箱待用。

2. Sephadex G-75 柱层析: 关于 Sephadex G-75 的溶胀处理及装柱方式请参见凝胶过滤法测定蛋白质的分子量实验。取浓缩后的粗提液 (5ml) 上 Sephadex G-75 ($2.5\times 90\text{cm}$) 柱层析进行初步纯化, 柱的平衡、洗脱均用 10mmol/L Tris-HCl (含 1mmol/L CaCl_2) 缓冲液, pH6.5。分步收集 8 毫升/管, 3 管/小时。利用 260nm 处的光吸收值作为检测指标。

3. DEAE-纤维素柱层析: 首先处理 DEAE-纤维素。将干纤维素粉末轻撒在 0.5mol/L HCl 溶液中 (每克交换剂约需 15ml 溶液), 自然沉下, 浸放 30 分钟以上。用耐酸漏斗抽滤, 如溶液变黄可重复洗至无黄色为止, 再用水洗净 NaOH 至中性 (用 pH 试纸检查), 然后换用 0.5mol/L NaOH 洗, 抽滤, 水洗, 酸洗, 再用 NaOH

洗。然后用平衡缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 含 1mmol/L CaCl_2 , pH6.5)平衡。

再装柱:向柱中先加入 1/3 高度的缓冲液,在搅拌下将烧杯中的 DEAE-纤维素悬浮液倾入柱中,待底面沉积起 1~2cm 的柱床后,打开柱的出口,随着缓冲液的流出,不断向柱中加悬浮液,这样凝胶颗粒便连续缓慢沉降,此时应注意控制流速,待沉积面到离柱的顶端约 3~5cm 处停止装柱。继续用缓冲液平衡,一般用 3~5 倍柱床体积的缓冲液在恒定压力下流过柱就可以了。新装成的柱若出现不均匀或气泡应重装。层析柱的大小为 1.5cm×30cm。

将经 Sephadex G-75 层析柱初步纯化所得到的微白蛋白溶液进一步用 DEAE-纤维素柱纯化。加样时首先检查柱床表面是否平整,若有凹凸不平者,可用细玻棒轻轻搅动表面,使交换剂重新自然沉降至表面平整,为避免加样时破坏表面平整,可用一合适大小的滤纸片覆于其上。然后将柱床表面存留较多的缓冲液吸去,留下少量使其从柱下端自然流出,当液面与柱表面相切时关闭流出口,用滴管慢慢将样品加入柱内,勿冲动表面,再打开出口,使样品渗入柱内,当样品将近完全渗入层析介质时,像加样一样用滴管仔细加入约 4cm 柱高的缓冲液,然后接上恒压洗脱瓶开始平衡,洗脱。经过一段时间平衡后,让微白蛋白充分与离子交换剂结合,再改用洗脱液淋洗,洗脱液为含 1.0~100mmol/L NaCl 线性梯度的平衡缓冲液。洗脱速度为 21 毫升/小时,7.0 毫升/管。同样用 260nm 紫外吸收值来检测。

4. 纯度测定:纯化的微白蛋白可以用 PAGE、SDS-PAGE、IEF-PAGE 等来鉴定其纯度,具体操作见有关实验。

实验二十四 凝胶过滤层析法测定蛋白质的分子量

一、原理

凝胶过滤 (Gel filtration) 也称排阻层析 (exclusion chromatography)、分子筛层析 (molecular sieve chromatography) 和凝胶层析 (Gel chromatography)。凝胶是由胶体溶液凝结而成的固体物质, 其内部具有很细微的多孔网状结构。凝胶层析的机理是分子筛效应, 当凝胶颗粒在合适溶剂中浸泡, 充分吸液膨胀, 然后装入层析柱内, 加入欲分离的混合物后, 再以同一溶剂洗脱。在洗脱过程中, 大分子不能进入凝胶内部而沿凝胶颗粒间的空隙最先流出柱外, 而小分子可以进入凝胶颗粒内部的多孔网状结构, 流速缓慢, 以致最后流出柱外, 从而使样品中分子大小不同的物质按顺序分离开。

凝胶层析的解释可用分子筛效应说明。当凝胶装柱后, 柱床容积称为“总容积” (V_t), 它由 V_0 、 V_i 、 V_g 三部分组成,

$$V_t = V_0 + V_i + V_g$$

式中 V_0 为“外水容积”, 或“外容积”或“孔隙容积”, 即存在于柱床内凝胶颗粒外面空隙之间的水相容积, 相应于一般层析法中柱内流动相的容积; V_i 为“内水容积”或“内容积”, 即凝胶颗粒内部所含水相的容积, 相应于一般层析法中的固定相容积, 它可从干凝胶颗粒重量和吸水后的重量求得; V_g 为凝胶本身的容积, $V_t - V_0 = V_i + V_g$ 。

“洗脱容积” (V_e) 是指自加入样品开始到组分最大浓度 (峰) 出现时所流出的容积, 它与 V_0 及 V_i 的关系为:

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

式中 K_d 为样品在两相中的分配系数, 即分子量不同的溶质在凝胶内部和外部的分配系数, 它只与被分离物质分子的大小和凝胶颗粒孔隙的大小分布有关, 而与柱形状无关, 对特定物质来说是一常数。对一层析柱凝胶床来说, 只要通过实验得知某一物质的洗脱容积 V_e , 就可求出其 K_d 值, 上式可以改写为 $K_d = \frac{(V_e - V_0)}{V_i}$

式中 V_0 可用不被凝胶滞留的大分子物质溶液求得, 如蓝色葡聚糖-2000 (MW=2000000), 血红蛋白, 印度黑墨水等; V_i 可用 $g \cdot W_R$ 求得 (g 为干凝胶重, W_R 为凝胶的吸水量, 以 ml/g 表示)。

K_d 可以有以下几种情况:

(1) 当 $K_d=0$ 时, 则 $V_e=V_0$, 即对于根本不能进入凝胶内部的大分子物质全排阻, 洗脱容积等于空隙容积。

(2) 当 $0 < K_d < 1$ 时, $V_e=V_0+K_d V_i$, 表示内容积只有一部分可被组分利用, 扩散渗入, V_e 在 V_0 和 V_0+V_i 之间变化。

(3) 当 $K_d=1$ 时, $V_e=V_0+V_i$, 即小分子可完全渗入凝胶内部时, 洗脱容积应为外水容积和内水容积之和。

(4) 当 $K_d > 1$ 时, 表示凝胶对组分有吸附作用, 此时 $V_e > V_0 + V_i$, 如一些芳香化合物的洗脱容积超过理论计算的最大值。

但实际工作中, 对小分子物质也得不到 $K_d=1$ 的数值, 尤其是交联度大的凝胶, 差别更大。这是由于一部分水相与凝胶结合较牢固, 成为凝胶自身的一部分, 因而不起作用及小分子不能扩散入内所致。此时的 $V_i \neq g \cdot W_R$, 可用实验计算出 V_i 值, 另一解决办法是不使用 V_i 和 K_d , 而以有效分配系数 K_{av} 代替 K_d , 将 $V_i =$

$V_i - V_0$ 代入前式, $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_i - V_0}$, 即 $V_e = V_0 + K_{av} (V_i - V_0)$ 即将来的水固定相 (V_i) 改为水与凝胶颗粒的固定相 ($V_i - V_0$), 而洗

脱剂 ($V_e - V_0$) 作流动相, K_{av} 与 K_d 对交联度小的凝胶差别较小, 而对交联度大的凝胶差别较大。

凝胶过滤操作方便, 设备简单, 周期短, 重复性能好, 一般不引起生物活性物质的变化, 广泛应用于脱盐, 浓缩高分子物质溶液, 生化物质的提纯, 去热源物质以及测定高分子物质的分子量。

目前使用的凝胶有葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶和琼脂糖及葡聚糖组成的复合凝胶。这些凝胶具有以下条件: 化学性质稳定, 不与待分离物质发生反应, 没有或只有极少量的离子交换基团, 且有足够的机械强度。本实验用的是葡聚糖凝胶 (dextran, 商品名为 Sephadex), 是由多聚葡萄糖与环氧化氯丙烷通过交联反应制成的有孔颗粒状凝胶。交联程度越大孔隙越小, 它不溶于有机溶剂, 能在水和电解质溶液中迅速溶胀。

不同型号的葡聚糖凝胶用英文 G 表示, 如 G-25、G-50、G-75、G-100 等, 后面的数字为凝胶吸水量乘以 10。在实际工作中, 超细颗粒主要用于分辨率十分高的柱层析中, 细颗粒用于制备, 中等和粗颗粒用于低操作压下高流速的制备柱层析。

根据凝胶层析的原理, 对同一类型化合物的洗脱特征与组分的分子量有关, 流过凝胶柱时, 按分子大小顺序流出, 分子量大的走在前面。通常以 K_{av} (或 K_d) 对分子量的对数作图可得一曲线, 称“选择曲线”, 曲线的斜率是凝胶性质的一个重要特征, 在一定范围内, 曲线愈陡分级愈好。在测定未知物的分子量时, 以使用曲线的直线部分为宜。

二、材料与试剂

1. Sephadex G-75: 用 0.05mol/L Tris-HCl (pH7.5) 的缓冲液水化。

2. 洗脱缓冲液: 0.05mol/L Tris-HCl (pH7.5), 内含 0.1mol/L NaCl。

3. 标准分离混合物：3mg/ml 蓝色葡聚糖，8mg/ml 肌红蛋白，0.3mg/ml DNP-天冬氨酸。溶剂为含 15% (V/V) 甘油的洗脱缓冲液。

4. 色谱柱：2.5×30cm。

5. 未知蛋白质溶液。

三、操作方法

1. 缓缓搅拌 Sephadex 悬浮液，然后将其慢慢地倒入预置好的层析柱中，使凝胶床达到 2.5×20~25cm，上端出口管用螺旋夹控制。千万不能产生气泡。当凝胶已完全沉降后，控制凝胶床上面的液面在 5cm 左右。

2. 接着就准备将待分离物质加到层析柱的上端，可用下列的方法 A 或方法 B。为了在加样时不致冲动柱体，你可剪一个比柱内径略小一点的滤纸片（如 2.4cm），再将其放入柱床上端。

法 A：用 1 毫升移液管取 1ml 混和液，将移液管尖端小心地插入柱中液体面下方 1cm 处，小心释放样品使其在凝胶床上端形成一个层，这个过程大约需 2 分钟完成。

法 B：将凝胶床上端的缓冲液液面降低至使凝胶刚好露出为止，用移液管吸取待分离的样品，并使移液管尖端的位置大约在胶床上方的 1cm 处，持好移液管，勿使位置变动，然后缓慢而连续地将样品释放到凝胶床上成层。

移液管取出，用 10ml 的试管放在部分收集器上用以收集在柱下端流出的溶液，并开始收集过程，此时需小心地将液体的流速控制在每 4 秒钟 1 滴（相当于 60ml/小时）。

3. 看到样品层刚好完全流入凝胶床时，向柱上端很小心地添加缓冲液至合适高度，以保证流速的稳定。注意，切勿搅动柱上端的凝胶，也不能使胶床上端无充裕的缓冲液以至于干涸。

4. 先收集 28ml 流出液，再开始按每管 4ml 收集，连续收集并对每管编号，当所有的有色物质均从层析柱中洗脱下来后，关闭

螺旋夹停止洗脱。然后在对应的波长下读各管的光吸收值。

- ①蓝色葡聚糖（蓝色）：650nm；
- ②肌红蛋白（琥珀色）：500nm；
- ③DNP-天冬氨酸（黄色）：440nm。

5. 洗脱完最后一个谱带（黄色）后，将 1ml 未知溶液加到层析柱内，先收集 28ml，然后按前述方法开始每 4ml 一管的连续收集。如果蛋白质无色就在 280nm 波长条件下读光吸收值，或由教师建议选定更方便的波长读光吸收值。

四、结果与计算

1. K_d 值的计算：利用每管的光吸收值对管号数作图（注意前 7 管里以 28ml 一次收集的，第一个 4ml 管的编号应为 8），应在每个峰位置标出测量波长，画一个坐标图，用观察法或算术平均法确定每个峰的确切位置。

算术平均法的计算式：

$$\bar{n}_i = \frac{\sum n_i A_i}{\sum A_i}$$

式中，

\bar{n}_i = 峰中点；

n_i = 峰中的每管编号；

A_i = 峰中连续各管的光吸收值。

对 1ml 的未知样品也按上法做。计算出肌红蛋白的 K_d 和未知样品的 K_d 值。

2. 肌红蛋白和未知样品分子量的估算：利用下表数据，用已知蛋白质的 K_d 值（纵坐标）对 $\lg MW$ 作图，再算出肌红蛋白和未知样品的分子量。

在图中的适当位置上标明肌红蛋白和未知样品的 K_d 和 MW 。

蛋 白 质	分子量	K_d
胰蛋白酶抑制剂(胰脏)	6500	0.70
胰蛋白酶抑制剂	9000	0.60
细胞色素 C	12400	0.50
α -乳清蛋白	15500	0.43
α -胰凝乳蛋白酶	22500	0.32
碳酸酐酶	30000	0.23
卵清蛋白	45000	0.12

注: K_d 值是在 Sephadex G-75, 0.05mol/L Tris-HCl (pH7.5), 内含 0.1mol/L KCl 的条件下测定的。

资料来自: Andrews(1970)。

实验二十五 凝胶层析法的应用

1. 脱盐

凝胶过滤的最重要应用之一就是脱盐,其原理是建立在生物大分子被排阻在网状凝胶之外(而盐分保留在内水体积, $K_d=1$)的基础上。这类实验用粗凝胶介质,高速洗脱即可实现。

(1) 试剂

BSA(小牛血清白蛋白)、磷酸盐缓冲液(pH7.0, 0.2mol/L)、NaCl、Sephadex G-25(粗级)。

层析用品

紫外分光光度计或 Lowry 法测蛋白用品、 AgNO_3 。

(2) 操作方法

先将 Sephadex G-25 进行预处理,然后用磷酸缓冲液悬浮装柱($1 \times 25\text{cm}$)。

样品的处理:取 10mg BSA,用 2ml 磷酸缓冲液(内含 40mg NaCl)溶解,此溶液即可上样。

洗脱用 0.2mol/L 的磷酸缓冲液,流速为 1ml/min, 2ml/管。

脱盐的检测可用蛋白质测定法和 Cl^- 检测法进行。

蛋白质的检测可用紫外光吸收法或 Lowry 法进行。

Cl^- 的检测用 AgNO_3 进行。

2. 浓缩效应

当 Sephadex G-25 这样的网状凝胶在蛋白质溶液中进行膨胀时,蛋白质不会进入胶内,而水则被胶吸附,因此蛋白质得以浓缩。

(1) 试剂

Sephadex G-25 (粗级)、BSA、NaCl(1mmol/L)。

(2)操作方法

将 10mg BSA 溶于 100ml 的 1mmol/L NaCl 溶液中,取 1ml 用于蛋白质分析。然后向其中加入 5g Sephadex G-25 (粗级),使其膨胀 10 分钟以上,小心倾去上清,将其体积量出并留取 1ml 用于蛋白质分析。

同样减少 Sephadex G-25 用量重复进行操作,分析最后结果。

蛋白质分析可用 Lowry 法来完成。

比较加 Sephadex G-25 前后的蛋白质浓度、蛋白质溶液体积和总蛋白量。

3. 配体与大分子的结合

生物大分子常与各种各样的配体结合,配体有染料、离子、药物、底物或效应分子等。二者的结合可用 $M+L=M-L$ 表示,其中 M 代表大分子, L 为自由配体, M-L 则代表配体-大分子复合物。凝胶过滤是研究结合的很好技术,因为 M 和 M-L 通常被排阻在胶上小孔之外,而自由配体可进入胶上小孔内。

本实验用两种方法研究这类问题。①区带色谱;②Hummel 和 Dreyer 方法。

(1)酚红与小牛血清白蛋白的结合

①试剂 0.2mol/L 乙酸缓冲液 pH4.5、酚红。

②操作方法

(a)用中级或细级 Sephadex G-25 装成 $1 \times 12\text{cm}$ 大小的层析柱备用。

10mg 酚红溶于 1ml 乙酸缓冲液(pH4.5),然后加入 20mg 血清白蛋白混和。

取 200 μl 该混和液上柱,用水进行洗脱,按 1ml/管收集。

向各收集管中加入 1 滴 1mol/L NaOH 和 3ml 的双蒸水,再于 520nm 波长下测光吸收值。

根据测定结果,绘出洗脱曲线,并计算出结合的酚红与总酚红

的比例。

① pH 对结合程度的影响

配制一系列不同 pH 值的乙酸缓冲体系 (pH 3.0~8.5), 然后取 5mg 酚红溶于该乙酸缓冲液 (1ml) 中, 其它操作均同上。并考查实验结果。

② 结合位点数的考查

上样溶液中除酚红的量有变化外, 其它维持恒定不变, 即取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8mg 酚红分别溶于乙酸缓冲液中 (pH 4.5, 0.2mol/L, 1ml), 其它操作均同①中一样。

③ 结果分析

v 为与蛋白质结合的配体量 (利用 Beer 定律计算), L 为自由配体浓度。

以 v/L 对 v 作图。

(2) 2' (3')-胞苷酸与胰核糖核酸酶 A 的结合。

① 试剂

0.1mmol/L 3'-CMP (或 2'-CMP) 溶液可用缓冲体系配制。

胰核糖核酸酶 A。

② 操作方法

用 Sephadex G-25 (中级或细级) 按规定程序装一个 0.5×80 cm 的长柱, 用配体溶液 (0.1mmol/L 3'-CMP) 进行预平衡。

取胰核糖核酸酶用配体溶液 (是否缓冲体系均可) 配成 6mg/ml 的浓度。取 0.5ml 该混和物上柱, 用配体溶液洗脱。

洗出液于 285nm 波长下检测。

实验二十六 血脂蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳

一、原理

醋酸纤维素薄膜电泳和滤纸电泳均属无阻滞支持物电泳。其典型电泳装置如下图所示。

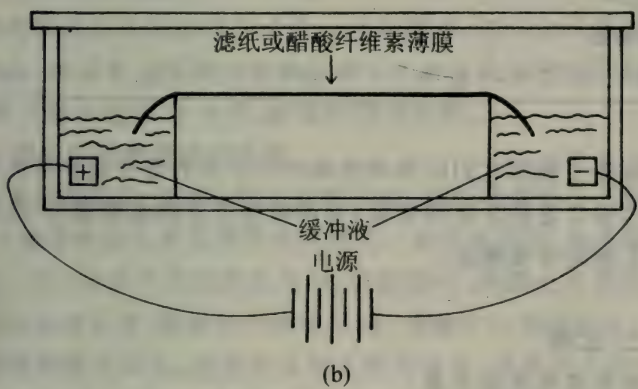
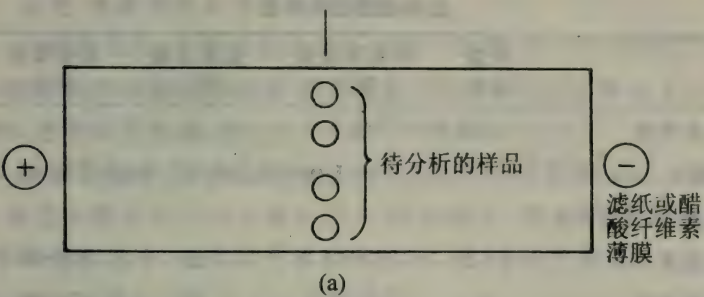
与纸层析相似,其待分析样品常点于纸带或薄膜带的中间,成斑或成带。点样方法有干点法和湿点法。一般干点法较湿点法的斑点小,分辨率高。干点法是将样品点于干滤纸上,而湿点法是将样品点于用缓冲液泡过的滤纸上。电泳采用的条件一般是 6~8 伏/cm 的电压,时间约为 45~60 分钟。显色方法依所分离物质的化学特性而定,或用显色剂喷雾或用显色剂浸泡。

目前滤纸电泳使用面越来越小,它主要用于小分子类荷电物质,如氨基酸、多肽、糖类和核苷酸类的分析。这些物质荷电少,泳动慢,一般用 200V/cm 左右的高压。

醋酸纤维素薄膜是以醋酸纤维素薄膜为支持物,它是纤维素的醋酸酯,即纤维素的羟基乙酰化而成,它减弱了极性分子与纤维素羟基的相互作用。它能溶于丙酮等有机溶剂中,所成的微孔薄膜均一细密,厚度以 0.1~0.15mm 为宜,过厚吸水性差,分离效果不好;过薄则机械性能差。醋酸纤维素薄膜与滤纸相比有如下优点:

①快速省时,分辨率高。由于其亲水性较滤纸小,电渗作用小,电泳时大部分电流由样品传导,分离速度快。对样品的吸附少,无

拖尾现象。背景脱色完全,条带清晰。灵敏度高,样品用量少,如血清蛋白电泳仅需 $2\mu\text{l}$ 血清,极度可至 $0.1\mu\text{l}$ 。



滤纸或醋酸纤维素薄膜凝胶电泳示意图

A:点有待分析样品的支持物俯视图

B:装有支持物的电泳槽侧面图

②应用面广,易于定量和保存。

脂蛋白主要在组织间通过血液运送非水溶性物质,如三酰甘油、胆固醇、胆固醇酯、磷脂等。脂蛋白分子量从 250000 至 4000000,颗粒大小在 $10\sim1000\text{nm}$ 间,可分为乳糜微粒、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白(见下表)。有关其生理功

能请参阅有关教材。

血清脂蛋白的特征

	乳糜微粒	极低密度脂蛋白	低密度脂蛋白	高密度脂蛋白
电泳分类	ω	前- β	β	α
密度	<0.95	$0.95\sim1.006$	$1.006\sim1.063$	$1.063\sim1.2$
组成(%干重计)				
蛋白质	1~2	5~10	25	30~35
三酰甘油	85	52~57	10	5~10
胆固醇	5	20	45	30
胆固醇脂				
磷脂	8~9	18	20	30

临床上利用它们区带间的相对百分比的改变或异常区带的出现作为临床鉴别诊断的依据。它还可用于分离血清蛋白、血红蛋白及同工酶的分离测定。

二、试剂

血浆或血清或全血；

0.1mol/L 草酸钠；

0.058mol/L 巴比妥缓冲液，pH8.6，内含 0.001mol/L EDTA 和 1% 血清白蛋白；

饱和油红 O 染料：用甲醇作溶剂；

1%(V/V) 苏丹黑 B：0.5ml 染料边加热边搅拌，溶于 50ml 乙二醇；

醋酸纤维素薄膜；

电泳装置。

三、操作方法

1. 血样的准备

血清、血浆或全血均可应用实验。

血清的制备:让刚采的血液在室温下放置 15~20 分钟进行凝结,然后将其中的液体转移至一试管,再于 $5000\times g$ 离心 15~20 分钟,上清即为血清,倒出后 $0\sim4^{\circ}\text{C}$ 可放置 1~2 天。

血浆的制备:新采血液 9ml 与 0.1mol/L 草酸钠 1ml 立即混匀,将混合物于 $5000\times g$ 离心 15~20 分钟后,将血浆(上清部分)转移到新容器中,血浆可直接用于电泳,或 $0\sim4^{\circ}\text{C}$ 保存 1~2 天。但冰冻后的样品会产生不正常的结果。

2. 样品的预染色

取血浆或血清样品 0.2ml 于一小试管中,加 0.1ml 苏丹黑染色液混匀,然后置于黑暗处室温放置 1 小时。此预染过的样品在 4°C 条件下最多放置 16 小时,故最好即用即染。

3. 醋酸纤维素薄膜的处理

取培养皿装入 100ml 巴比妥缓冲液,然后将薄膜小心地放入其内(用镊子取放),使其漂浮在液面上。若迅速润湿,整条薄膜色泽深浅一致,则表明薄膜质地均匀;若润湿时,薄膜上出现深浅不一的条纹或斑点等,则表明为厚薄不匀。实验中应选择前者。将选用的薄膜用镊子轻压,使其全部浸入缓冲液内,待膜完全浸透(约半小时)后取出,夹在洁净的滤纸中间吸去多余的缓冲液,同时分辨出光泽面和非光泽面。

在膜的非光泽面点样,点样位置距一端 1.5cm,位置用铅笔轻轻标出,用微量取样器取 $10\mu\text{l}$ 血清/血浆(预染色和未染色的)均匀地点在点样区内,形成具有一定宽度、粗细均匀的直线。一个点样区点一种样品。

4. 电泳

在点样前,应先准备电泳装置。在电泳槽的两个池内加入等高的缓冲液。剪尺寸合适的滤纸条,将双层滤纸条附着在电泳槽的支

架上与支架的前沿对齐,另一端浸入电极槽的缓冲液内,然后滤纸用缓冲液全部润湿并驱除气泡,使滤纸紧贴于支架上,即为“滤纸桥”。同样在另一侧制作“滤纸桥”。

将点好样的薄膜按非光泽面向下贴在电泳槽支架的滤纸桥上,盖上盖子,平衡 10 分钟,同时将负极接于靠近点样端的电极槽内,然后打开电源通电,调节电压和电流,使电流保持在 2mA/条薄膜,通电 30~45 分钟,关掉电源,取出薄膜迅速于 110 °C 的烘箱中烘干。

5. 用油红染色

将未预染的样品薄膜浸泡于油红溶液中 2~4 天。在此期间,要用镊子将薄膜上下摇动几次,再将此薄膜用蒸馏水或 7.5% 乙酸浸泡 30~60 分钟,以去除过重的染色。然后将其晾干(如需要可再用己烷浸泡 30 分钟去除多余的染料)。

四、结果分析

将电泳结果记录在实验报告本上。可利用文献与标准的电泳结果比较,有否异常带?

五、思考题

1. 电极缓冲液可重复用几次,但重要的是每次用过之后要互换电极方向,为什么?
2. 若用 PAGE 法来完成此实验,有何优缺点?
3. 设计一个测定脂蛋白中蛋白亚基分子量的方法。

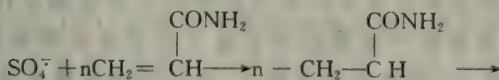
实验二十七 盘状聚丙烯酰胺凝胶 电泳分离血清蛋白质

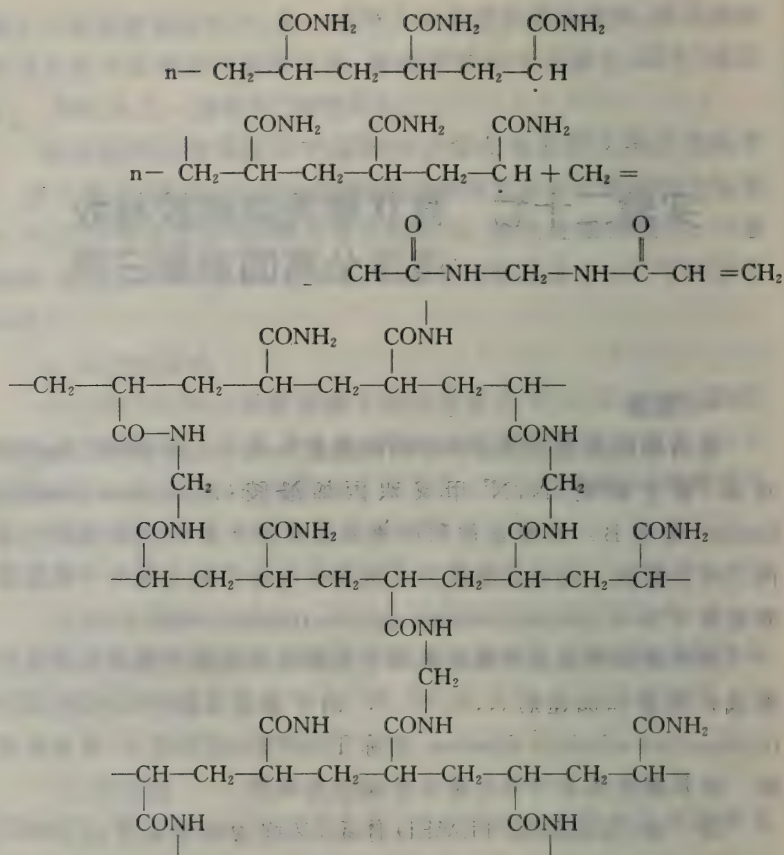
一、原理

聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺(acrylamide, 简称 Acr)和双体(或交联剂)N,N'-甲叉双丙烯酰胺(methylene-bisacrylamide, 简称 Bis)在催化剂和加速剂的作用下聚合交联成的三维网状结构凝胶。凡以此凝胶为支持物的电泳均称为聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis)。

聚丙烯酰胺是由丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺在催化剂过硫酸铵或核黄素和加速剂 N,N,N',N'-四甲基乙二胺(N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine, 简称 TEMED)的作用下, 聚合而成的。按其催化体系可将此聚合反应分为两类:

第一类, 过硫酸铵-TEMED 体系, 又称为化学聚合, TEMED 催化过硫酸铵水溶液产生出游离氧原子, 然后激活单体, 形成单体长链, 在交联剂的作用下聚合成凝胶, 在碱性条件下凝胶易聚合, 其聚合速度与过硫酸铵浓度的平方根成正比。此法制得的凝胶孔径较小, 常用于制备分离胶。





第二类,核黄素-TEMED 体系:此为光聚合作用。光聚合作用通常需痕量氧原子存在才能发生,核黄素在 TEMED 及光照条件下还原成无色核黄素,后者被氧再氧化形成自由基,从而引发聚合作用。过量氧会阻止链的增长。该法主要用于制备孔径大的凝胶。核黄素对活性物质的影响较小。

控制凝胶总浓度及交联度可以得到合适性能及孔径的凝胶。在操作时可根据被分离物的分子量大小选择所需凝胶的浓度范围。通常以 7.5%凝胶作标准胶,一般可获得较满意的效果。

聚丙烯酰胺凝胶电泳按其有无浓缩效应可分为连续及不连续系统。在连续系统中缓冲液 pH 值及凝胶浓度相同,带电颗粒在电场作用下主要靠电荷及分子筛效应得以分离;在不连续系统中缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度及电位梯度均不连续,带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应和分子筛效应,还具浓缩效应,具有良好的清晰度及分辨率。按器材来分主要有垂直的圆盘电泳和板状电泳。

1. 样品浓缩效应

(1)凝胶孔径不连续性:在不连续圆盘 PAGE 中,凝胶由浓缩胶和分离胶两部分组成,前者孔径大,后者孔径小,在电场作用下,蛋白质颗粒在大孔胶中泳动时遇到的阻力小,移动速度快,当进入小孔胶时,蛋白质颗粒泳动受到的阻力大,移动速度减慢。因而在二层凝胶交界处,由于凝胶孔径的不连续性使样品迁移受阻而压缩成很窄的区带。

(2)缓冲体系离子成分及 pH 值的不连续性:在二层凝胶中均有三羟甲基氨基甲烷(简称 Tris)及 HCl。Tris 的作用是维持溶液的电中性及 pH 值,是缓冲配对离子。HCl 在任何 pH 值溶液中都易解离出氯离子(Cl^-),它在电场中迁移率快,走在最前面故称为快离子或前导离子。在电极缓冲液中的甘氨酸(Gly)在 pH8.3 的环境中易解离出甘氨酸根($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$),而在 pH6.7 的凝胶缓冲体系中其解离度很小,仅有 0.1%~1%,因而在电场中迁移很慢,称为慢离子或尾随离子。血清中,大多数蛋白质 pI 在 5.0 左右,在 pH8.3 或 6.7 时均带负电荷,在电场中均移向正极,其有效迁移率介于快、慢离子之间,于是蛋白质就在快、慢离子形成的界面处,被浓缩成为极窄的区带。三者的有效迁移率顺序为: $m_{\text{氯}} \alpha_{\text{氯}} > m_{\text{蛋白}} \alpha_{\text{蛋白}} > m_{\text{甘}} \alpha_{\text{甘}}$ (m 为迁移率,α 为解离度),当进入 pH8.9 的分离胶时,甘氨酸解离度增加,其有效迁移率超过蛋白质,因此 Cl^- 及 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ 沿着离子界面继续前进。蛋白质分子由于分子量大,被留在后面,然后再分成多个区带,因此浓缩胶与分离胶之间 pH 的不连续性是为了控制其有效迁移率。在浓缩胶中要求

慢离子较所有被分离样品的有效迁移率低,以使样品在快、慢离子界面之间被浓缩。进入分离胶后,慢离子的有效迁移率比所有样品的有效迁移率高,使样品不再受离子界面的影响。

(3)电位梯度的不连续性:电位梯度的高低与电泳速度的快慢有关($v=mE$)。迁移率低的离子在高电位梯度中可以与迁移率高而处于低电位梯度的离子具有相似的速度,在不连续系统中,电位梯度的差异是自动形成的,电泳开始后由于快离子迁移率最大,就会很快超过蛋白质,在快离子后面形成一个离子浓度低的区域即低电导区。低电导区就具较高的电位梯度,而高的电位梯度又使蛋白质和慢离子在快离子后面加速泳动。当快离子、慢离子和蛋白质的迁移率与电位梯度的乘积彼此相等时,三者的泳动速度就相等。在快离子和慢离子的移动速度相等的稳态建立后,二者之间形成一个稳定而又不断向阳极移动的界面,即在高、低电位梯度之间形成一个迅速移动的界面。由于蛋白质的有效迁移率恰好位于快、慢离子之间,因此也就聚集在这个移动界面附近,被压缩成一个狭小的中间层。

2. 分子筛效应

分子大小和形状不同的蛋白质通过一定孔径分离胶时,受阻滞的程度不同而表现出不同的迁移率,此即分子筛效应。经过浓缩胶的浓缩效应后,快、慢离子及蛋白质均进入 pH8.9 的同一孔径的分离胶中,此时高电压消失,在均一的电位梯度下,由于 Gly 解离度增加,加之分子量较小,其有效迁移率增加,赶上并超过各种血清蛋白质。在同一孔径的凝胶中各种血清蛋白分子迁移速度与分子量大小和形状密切相关,分子量小且为球形的蛋白所受阻力小,移动快,走在前面,反之阻力大,移动慢,走在后面。从而通过凝胶的分子筛作用将各种蛋白质分成各自区带。

3. 电荷效应

进入 pH8.9 的分离胶后,各种血清蛋白所带净电荷不同,而有不同的迁移率。表面电荷多,则迁移快;反之则慢。

因此各种蛋白质按电荷多少,分子量大小及分子形状以一定顺序排列成一个个圆盘状的区带。此称为圆盘电泳。

PAGE 的连续电泳也有很广的应用范围,但无浓缩效应,主要利用分子筛效应和电荷效应进行分离,其条件温和,对生物活性的保持有益。

聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质有一系列优点:在合适的浓度范围内,凝胶透明,有弹性,机械性能好,化学性能稳定,与被分离物质不起反应,几乎无电渗作用;凝胶孔径可调节;分辨率高。目前在蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离、定性、定量及小量制备、分子量测定、等电点测定等诸多领域广泛采用 PAGE。

二、试剂

新鲜不溶血的动物血清

凝胶缓冲液(pH8.9):取 Tris 36.6g, TEMED 0.23ml, 加 1mol/L HCl 48ml, 加重蒸水至 80ml, 溶解, 调 pH8.9, 然后加重蒸水至 100ml。棕色瓶 4℃保存。

分离胶贮液(28% Acr-0.735% Bis):取 28.0g 丙烯酰胺和 0.735g 甲叉双丙烯酰胺, 加重蒸水使其溶解后定容至 100ml, 过滤后置棕色瓶 4℃保存。

浓缩胶缓冲液(pH6.7):取 5.98g Tris, 0.46ml TEMED 和 48ml 1mol/L HCl, 加重蒸水至 80ml, 调 pH 值至 6.7 后定容到 100ml, 棕色瓶 4℃保存。

浓缩胶贮液:取 10.0g Acr 和 2.5g Bis, 加重蒸水溶解后定容到 100ml, 滤后置棕色瓶 4℃保存。

过硫酸铵溶液:取分析纯过硫酸铵(AP)0.14g 用重蒸水定容到 100ml, 棕色瓶 4℃保存, 当天用当天配制。

核黄素溶液:取 4.0mg 核黄素用重蒸水定容到 100ml, 棕色瓶 4℃保存。

40%蔗糖溶液(W/V)。

Tris-甘氨酸电极缓冲液(pH8.3):取 6.0g Tris, 甘氨酸 28.8g,加重蒸水至 900ml,调 pH8.3 后定容至 100ml,4℃保存。用前稀释 10 倍。

0.1%溴酚蓝指示剂。

三、操作方法

1. 安装圆形玻管

取玻璃管洗净烘干后将其下端口用 parafilm 三层或橡胶玻璃头封严,然后垂直安放在试管架上备用,或直接插于电泳槽内。

2. 配胶

分离胶的配制比例为 pH8.9 的分离胶缓冲液 2.50ml,28%凝胶贮液 5.00ml,重蒸水 2.50ml,0.14%AP 10ml。加 AP 前需充分混匀,置真空干燥器中抽气 10 分钟。分离胶的终浓度为 7%,终体积为 20ml。

浓缩胶的配法:取浓缩胶缓冲液(pH6.7)1ml,浓缩胶贮液 2ml,40%蔗糖 4ml,0.004%核黄素溶液 1ml,加核黄素液之前需充分混匀,置真空干燥器中抽气 10 分钟,所配浓缩胶浓度为 2.5%,终体积为 8ml。

3. 灌胶

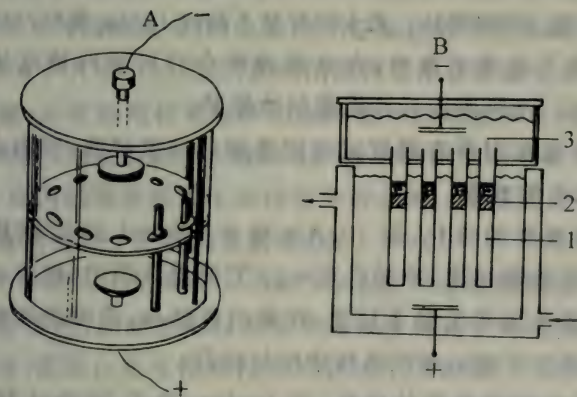
不连续体系凝胶的灌注分两步。分离胶的制备:混合好的凝胶溶液用细长头滴管加至准备好的玻管内,加胶高度距上端口 2cm 左右,用 1ml 注射器在凝胶表面轻轻加一层重蒸水(沿管壁),约 3~5mm,用于隔绝空气,使胶面平整。30~60 分钟后凝胶完全聚合,此时可见水与凝胶面有折射率不同的界线出现。用滤纸条吸去多余水分,勿碰胶面。

浓缩胶的制备:混合好的浓缩胶溶液用细长头滴管加到分离胶的上面,使其液面距上端口约 0.5cm,然后置于日光灯(10cm 远)或阳光下照射进行光聚合。注意温度不能太高,凝胶由淡黄色变成乳白色表明聚合作用开始,继续光照半小时,聚合即可完成。

而后继续放置 30~60 分钟,用滤纸条吸去多余水分。

4. 加样、电泳

将制备好的凝胶玻管插入圆盘电泳槽上,加少许电极缓冲液检查一下是否有渗漏现象,若有解决之。然后在上下极槽内加入适量的电极缓冲液,使上下极电路畅通。然后加血清蛋白样品(血清:40%蔗糖按 1:1 混匀,再加少许溴酚蓝)5~10 μ l,加样时用微量注射器将样液通过缓冲液小心地加在凝胶表面,将所有玻管内均加完样品后即可开始电泳。按上槽接负极、下槽接正极的方式接到直流稳压电泳仪上,开始电泳,电流按 1mA/管,当样品进入分离胶时,将电流调至 3mA/管。当染料移至距下端 1cm 时,将电流调回至零,关电源。分别收集上下极槽电泳缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存,还可再用。



5. 固定染色

取出玻管,用注射器吸满自来水后将长针头插到凝胶与管壁之间,推动注射器,同时转动玻管,使针头在管壁与胶之间前进,胶条在水的压力及滑润作用下自玻管中脱出。然后将干净的胶条浸泡在氨基黑 10B 染液中,染色 10 分钟,同时也进行了固定。

6. 脱色

用水冲去胶条表面染料,置于 7% 乙酸中浸泡漂洗,更换醋酸

液数次,直到背景色脱去。脱色液经活性炭脱色可再利用。也可在 50℃水浴中或脱色摇床上进行脱色。

7. 将结果绘出或保存实物,注意电泳方向。

四、说明

1. 本电泳也可采用连续凝胶系统。其 7%凝胶溶液的配比为分离胶缓冲液(pH8.9):凝胶贮液:水:0.14%AP=1:2:1:4,前三者混合后抽气,再与抽过气的 AP 液混匀,然后灌胶。

2. 本实验的方法同样可用于聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,该法具有板型薄、易冷却、分辨率高、便于比较和扫描等优点。关于垂直板型电泳的操作可参阅乳酸脱氢酶的 PAGE 操作方法。

3. 电泳中在样品中的盐浓度应尽量低,否则有拖尾现象,可用透析法或凝胶过滤法脱盐。最大加样量不超过 100 μ g 蛋白/100 μ l。

4. 在不连续电泳中,在分离胶聚合后可进行预电泳(1mA/管,1 小时),洗净胶面后才能灌制浓缩胶。

5. 在电泳时所有凝胶试剂应选用高纯度试剂,否则会影响胶的聚合和电泳效果。

丙烯酰胺的纯化:取 70gAcr 溶于 1000ml 50℃预热的氯仿中,溶解后趁热过滤,冷却后至-20℃低温冰箱中,则有白色结晶析出,用预冷的布氏漏斗抽滤,收集白色结晶,再用预冷的氯仿淋洗几次,真空干燥后置棕色瓶中密封保存。

甲叉双丙烯酰胺的纯化:取 12gBis,溶于 1000ml 预热 40~50℃的丙酮中,趁热过滤,冷却后于-20℃低温冰箱中,待结晶析出后,用预冷的布氏漏斗抽滤,收集结晶,用预冷丙酮洗涤数次,真空干燥后置棕色瓶中密封保存。

Acr、Bis 的贮液会发生分解,一般仅能保存 1~2 个月,纯 Acr 水溶液 pH 为 4.9~5.2,pH 值变化不大于 0.4pH 单位时能使用。

Acr 和 Bis 均为神经毒剂,对皮肤有刺激作用,操作时宜戴手套和口罩,纯化应在通风柜内进行。

实验二十八 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE) 测定蛋白质的分子量

一、原理

一个蛋白质混合样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳以后能按其电泳迁移率不同而彼此分开,这是由于各组分所带电荷的差异(电荷效应)和分子大小不同之故。要利用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量,必须将电荷效应所引起的差异消除或减小到可以忽略不计的程度,那么蛋白质在凝胶上的泳动率则完全取决于分子量。而 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳体系中所含的一定浓度之 SDS 就能够消除蛋白质分子之间的电荷差异。

SDS(sodium dodecyl sulfate)即十二烷基磺酸钠是一种阴离子表面活性剂,能破坏蛋白质分子间以及与其它物质分子之间的非共价键,使蛋白质变性而改变原有的空间构象。SDS 能按一定的比例与蛋白质分子结合成带负电荷的复合物,其负电荷远远超过了蛋白质原有的负电荷,因而消除或掩盖了不同种类蛋白质间原有的电荷差异,不同的蛋白质-SDS 复合物都带有相同密度的负电荷,且具有相同的构象。不同大小的蛋白质几乎具有相同的 Q/r 比值。蛋白质-SDS 复合物在电场中的泳动不再受原有电荷和形状的影响,而只与分子量的大小有关。当蛋白质分子量在 11700~165000 之间时,电泳迁移率与分子量的对数呈直线关系,

$\lg MW = K - bm$ (式中 MW 为蛋白质分子量, K 为常数, b

为斜率, m 为迁移率)

SDS-PAGE 有连续和不连续两种方法。不连续系统的原理与不连续 PAGE 相同, 但操作上有别: ① SDS-PAGE 在电极缓冲液、凝胶缓冲液中均加进了 SDS, 蛋白质样品溶解液含有 1% SDS 和 1% 巯基乙醇, 样品液加样前经过 37 °C 保温 3 小时或沸水浴加热 3 分钟; ② 不连续 SDS-PAGE 分离胶浓度为 13%, 否则小分子量蛋白质 (<25000 者) 泳动太快。两种体系有各自的样品溶解液及缓冲液, 但加样方式、电泳过程及固定、染色和脱色方式完全相同。

二、试剂

磷酸缓冲液 (0.2mol/L 磷酸-SDS 缓冲液, pH7.0): 称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8.7g, 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 51.6g, SDS (十二烷基磺酸钠) 2g, 加蒸馏水溶解并定容到 1000ml。

凝胶贮备液: 丙烯酰胺 22.2g, 双叉丙烯酰胺 0.6g, 用水溶解并定容到 100ml, 贮于棕色瓶。

过硫酸铵溶液、10% TEMED。

透析缓冲液 (0.01mol/L 磷酸缓冲液, pH7.0): 取磷酸二氢钠 0.44g, 磷酸氢二钠 2.58g, 以水定容到 100ml (此即 0.1mol/L 磷酸缓冲液, pH7.0)。再取此缓冲液加 1g SDS 和 1ml β -巯基乙醇稀释到 1000ml 即可。

样品溶解液: 取 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 50ml, 加 SDS 0.5g 及 β -巯基乙醇 0.5ml 即可。用这种溶液溶解固体正好。若样品为水溶液, 则需将样品溶解液的浓度提高一倍, 再与等体积的样品混合。

加样液: 10ml 透析缓冲液加 1ml β -巯基乙醇及 5ml 甘油, 1.5ml 0.05% 溴酚蓝溶液。

0.05% 溴酚蓝溶液: 2.5mg 溴酚蓝加 0.01mol/L pH7.0 磷酸缓冲液到 5ml。

✓ 染色液: 0.25g 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 溶于 45.5ml 甲醇及 9.2ml 冰醋酸中, 以水补足到 100ml。

✓ 脱色液: 50ml 甲醇加 75ml 冰醋酸中, 加水到 1 升。

电极缓冲液 (0.1% SDS, 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液): 称取 SDS 1g, 加 500ml 0.2 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液, 再用蒸馏水定容至 1000ml。

三、操作方法

1. 凝胶柱的制备

先将干净的玻璃管准备好, 垂直放置。再将凝胶缓冲液 15ml, 凝胶贮备液 13.5ml, 水 1.05ml, 10% TEMED 0.45ml 及过硫酸铵 22.5mg 混合溶解, 倒入玻管中。各管凝胶长度应相等, 并避免有气泡。

2. 样品的处理

各标准蛋白及被测样品均用溶解样品液溶解, 并使其蛋白浓度为 2mg/ml, 37 °C 水浴保温 2 小时, 对透析缓冲液透析 15~16 小时。然后每种蛋白及样品液均加入等体积的加样液。

3. 电泳

各种蛋白及样品取 50~100 μ l, 分别加于凝胶顶端。上槽接负极, 下槽接正极, 电泳 8mA/管, 电压 40~50 伏/管, 电泳 4~5 小时, 溴酚蓝到达凝胶的 3/4 处。然后将凝胶从玻管中取出, 将溴酚蓝处作一标志 (穿一细金属丝), 并量出凝胶的长度。

4. 染色及脱色

将凝胶浸于染色液考马斯亮蓝 R₂₅₀ 中 2 小时, 再浸于脱色液中, 并经常更换脱色液至背景颜色脱尽, 量出胶长及各蛋白区带移动的距离。

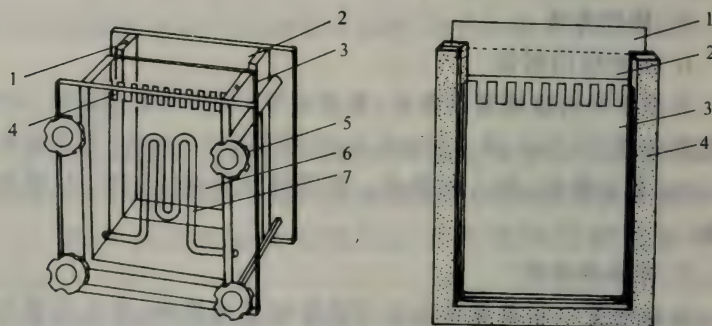
5. 绘制标准曲线

将大平皿放在一张坐标纸上, 量出加样端距金属丝间的距离以及各蛋白样品区带中心与加样端的距离, 按下式计算相对迁移

率(m):

$$\text{相对迁移率}(m) = \frac{\text{蛋白样品距加样端迁移距离(cm)}}{\text{溴酚蓝区带中心与加样距离(cm)}}$$

以标准蛋白的相对迁移率为横坐标,标准蛋白质分子量为纵坐标在半对数坐标纸上作图,可得一条标准曲线。根据未知蛋白质的相对迁移率可直接在标准曲线上查出其分子量。



四、说明

1. 本操作同样适用于垂直板状 SDS-PAGE, 只是灌胶操作上有别。在垂直板状连续 SDS-PAGE 中电泳条件为开始时电流为 20mA, 待样品进入分离胶后, 将电流调至 50mA, 一般需 5~6 小时。在不连续 SDS-PAGE 中, 开始时电流为 10mA, 待样品进入分离胶后调至 20~30mA, 若进行预电泳可采用 30mA, 60~120 分钟。

2. 有关 SDS 的重结晶: 取 20g SDS 于圆底烧瓶中, 加 300ml 无水乙醇及半匙活性炭, 烧瓶接上冷凝管后在水浴中加热至乙醇微沸腾, 回流约 10 分钟, 用热布氏漏斗趁热过滤。滤液应透明, 冷却至室温后移入 -20℃ 低温冰箱中过夜, 次日用预冷的布氏漏斗抽滤, 再用少量 -20℃ 预冷的无水乙醇洗涤白色沉淀 3 次, 尽量

抽干,将其置真空干燥器中干燥或置 40°C 以下的烘箱中烘干。

3. 凝胶浓度的选择:分子量在 $25000\sim 200000$ 范围的蛋白质宜用终浓度为 5% 的凝胶,分子量在 $10000\sim 70000$ 范围者宜用 10% 的凝胶,分子量在 $10000\sim 50000$ 范围者宜用 15% 的凝胶,此时各胶的交联度均为 2.6%。测定分子量时必须与标准蛋白质同时电泳,其迁移率最好在 0.2~0.8 范围内。所得分子量为蛋白质亚基或单条肽链的分子量,需用其它法加以校正。

4. SDS 的用量:当 SDS 单体浓度在 1mmol/L 以上时,每克蛋白质可结合 1.4gSDS ;当 SDS 低于 0.5mmol/L 时,其结合比一般为 0.4gSDS/g 蛋白质。巯基乙醇还原蛋白质中的二硫键,有利于 SDS 与蛋白质的结合。样品溶解液中 SDS 的浓度至少比蛋白质的量高 3 倍,一般为 10 倍,否则影响迁移率。同时样品溶解液中的离子浓度要低,最高不超过 0.26,样品的离子浓度也应较低,否则要透析去盐。

实验二十九 等电聚焦法测定 蛋白质等电点

一、原理

等电聚焦法是一种特殊的聚丙烯酰胺凝胶电泳法。其特点是在凝胶柱中加入一种称为两性电解质载体(Ampholine)的物质,从而使凝胶柱在电场中形成连续的 pH 梯度。我们已知,蛋白质分子是典型的两性电解质分子,它在大于其等电点的 pH 环境中以阴离子形式向电场的正极泳动,在小于其等电点的 pH 环境中以阳离子状态向电场负极移动。这种泳动只有在等于其等电点的 pH 环境中才能停止。如果在一个 pH 梯度的环境中将含有各种不同等电点的蛋白质混合样品进行电泳,那么在电场作用下,不管这一大群混杂的蛋白质分子原始分布如何,各蛋白质分子将按照它们各自的等电点大小在 pH 梯度中相对应的位置进行聚集,经过一定时间以后,不同的蛋白质组分便分隔在不同的区域之中。这种按等电点大小在 pH 梯度某一相应位置进行聚集的行为即是聚焦。蛋白质聚焦的部位之蛋白质质点的净电荷为零,测定此部位凝胶的 pH 值,即可知该蛋白质的等电点。

等电聚焦法用聚丙烯酰胺作支持物与圆盘电泳有很大差异,前者不利用凝胶的分子筛作用。

等电聚焦法消除了扩散作用的影响,电泳时间愈长,区带愈窄,所测物质愈集中,所以它较一般电泳法的分辨率高。

应用凝胶等电聚焦法不仅可以测定两性电解质的等电点,而

且能将具有不同等电点的混合物进行分离鉴定。

二、试剂

两性电解质载体凝胶溶液:丙烯酰胺 3.5g,甲叉双丙烯酰胺 0.1g, pH3~10 两性电解质载体 2.5ml,核黄素溶液(4mg/ml) 12.5ml,加水至 50ml。

蛋白质溶液:纯牛血清白蛋白 7mg,溶于 1ml 蒸馏水。

5%磷酸溶液:85%磷酸 29.4 ml 加水稀释至 500ml。

2%氢氧化钠溶液:NaOH 10g 溶于蒸馏水定容至 500ml。

染色液:取考马斯亮蓝 R₂₅₀ 0.1g,冰乙酸 10ml,甲醇 35ml,加蒸馏水溶解后定容至 100ml,棕色瓶保存。

脱色液:无水乙醇 50ml,冰乙酸 20ml,用蒸馏水定容至 200ml。

保存液:无水乙醇 25ml,冰乙酸 10ml,甘油 5ml,加蒸馏水定容至 100ml。

三、操作方法

1. 取 8ml 两性电解质凝胶溶液,置于梨形瓶中,加入 0.14ml 白蛋白溶液(7mg 白蛋白/ml),轻轻摇动混匀,抽去气泡。

2. 取内径 0.5~0.6cm,长 10cm 的干净玻管 4 支,垂直放置在制胶管架上,玻管底端紧紧与橡皮塞相贴以保证底端封闭。加入 40%蔗糖 3~4 滴,然后加第 1 步制好的凝胶液于玻管中,直至离玻管上端 1cm 处为止,上面再以 2~3 滴蒸馏水覆之,注意不要搅动凝胶,既要保证混合液与空气隔绝,又要保持其表面平整。

3. 等管内凝胶凝聚后,用滤纸吸去顶端的水,拔去管底部的橡皮塞,使蔗糖液流出,并用少量蒸馏水洗,然后将玻管放入圆盘电泳装置中,上槽注以 5%磷酸溶液,接正极;下槽装 2%NaOH 溶液,接负极。注意应把凝胶与电极液之间存在的气泡排净。打开直流电源,恒压 160 伏,聚焦约 4 小时,当电流接近于零时停止电泳。

4. 聚焦结束后取出凝胶管,先用蒸馏水将其两端洗几遍,再用带有长针头(长约 10 厘米)的注射器吸水进行剥胶。先把长针头插入凝胶柱与玻管内壁之间,慢慢旋转玻管,一边压水一边将针头呈螺旋式推进,使凝胶条与管壁脱离,然后用吸耳球对玻管一端轻轻加压,使凝胶条从玻管内滑出。标明凝胶条的正负端,并对凝胶条编号。

5. 将凝胶条平放于胶条托板(黑色)上,用尺量出每一根凝胶条的长度并记录。

6. 将量过长度的凝胶条分别放入培养皿中,加入 12% TCA 固定 2 小时以上,即可看见白色蛋白带出现。

7. 将量过长度而未用 TCA 固定的另外一凝胶条放在玻璃板上,按照从正极端到负极端的顺序用刀片切成 5mm 的小段,各浸泡于 1ml 蒸馏水中过夜,测其 pH 值并记录。

8. 量出经 TCA 固定后的凝胶条长度以及凝胶条的正极端到蛋白质白色沉淀区带中心即聚焦部位的距离,并记录。

9. 数据的处理:

① pH 梯度曲线的制作:以凝胶柱长度为横坐标, pH 值为纵坐标作图可得 pH 梯度曲线。由于所测得的每一管之 pH 值是以 5mm 长的小段胶条的 pH 混合平均值,作图时应把此 pH 值视为 5mm 小段的中心区 pH 值,即第一小段的 pH 值所对应的胶条长度应为 2.5mm,依次类推有 $(5n-2.5)$ mm 的式子。

② 蛋白质样品等电点的求算:蛋白质聚焦部位距正极端的实际长度 L_p 按下式计算:

$$L_p = l_p \times \frac{l_1}{l_2}$$

式中: l_p : 所量出的蛋白质白色沉淀区带中心距凝胶正极端的长度。

l_1 : 凝胶条固定前的长度。

l_2 : 凝胶条固定后的长度。

根据蛋白质聚焦部位距凝胶条的实际长度 L_p , 从 pH 梯度曲

线上查得的对应 pH 值即为该蛋白的等电点。

四、说明

1. 等电聚焦电泳的支持介质可用聚丙烯酰胺(PAA)也可用琼脂糖,在本电泳中并无分子筛效应,一般 PAA 浓度为 5% 或 7%,其 Acr 纯度要求高,须重结晶,否则会引起 pH 梯度的阴极漂移,一般约为 1/3pH 单位。

2. 等电聚焦电泳方式有柱电泳、垂直板电泳和超薄型水平板电泳,也可与 SDS-PAGE 等结合进行双向电泳如 IEF/SDS-PAGE,IEF/PG-PAGE。

3. 两性电解质:商品有 Ampholine(LKB 公司),Servalyte(Serva 公司),Pharmalyte(Pharmacia 公司),及国产两性电解质载体。其浓度一般为 40% 或 20%,其 pH 范围分别为 2.5~5,4~6.5,5~8,6.5~9,8.5~10,3~10 等。在凝胶中的浓度一般为 1%~3%,国产试剂有时导电性差,一般终浓度为 2%。两性电解质载体的选择主要依据被测物质的大概 pH 范围。

4. 样品问题:样品要脱盐,否则区带扭曲,再者要彻底溶解,颗粒易引起拖尾。样品溶液中可加变性剂,如尿素(6~8mol/L),去污剂等。加样量取决于样品中蛋白质的种类及数量和检测方法的灵敏度。一般以 0.5~1mg 蛋白/ml 溶液为宜,最适加样体积约 10~30 μ l,对于不稳定的样品可进行预电泳。

5. 电极缓冲液应据两性电解质 pH 范围加以选择,可参见相应产品的说明书。

实验三十 蛋白质 N-末端的测定

测定蛋白质 N-末端的方法很多,常用的有二硝基氟苯法(FDNB 法)、异硫氰酸苯酯法(简称 PTH 法)和氨肽酶法等。近年来普遍采用 DNS-氨基酸聚酰胺薄膜层析法和 DNP-氨基酸聚酰胺薄膜层析法。

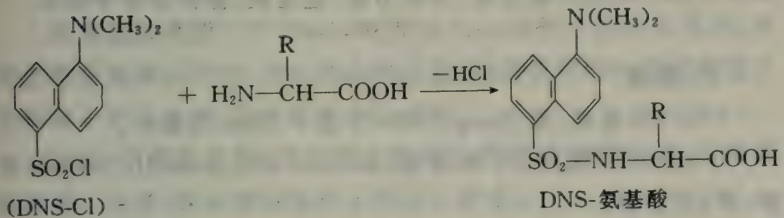
聚酰胺(polyamide)是一类称为锦纶或尼龙的化学纤维原料,例如锦纶 6、锦纶 66、锦纶 1010 等。由于这一类高分子物质含有大量的酰胺基团,故统称为聚酰胺。酰胺基团能同酚类、酸类、醌类以及硝基化合物等极性物质形成氢键。聚酰胺对被分离物质吸附能力的大小取决于二者之间的氢键的强弱。在层析中,展层溶剂与被分离物质在聚酰胺表面竞相形成氢键。选择适当的展层溶剂,使被分离物质在溶剂与聚酰胺表面之间的分配系数有较大差异,经过吸附与解吸附的展层过程,就会形成一个分离顺序,达到离析的目的。聚酰胺固定于涤纶片基或其它载片上而形成一种质地均匀紧密的多孔薄膜结构即聚酰胺薄膜。

一、原理

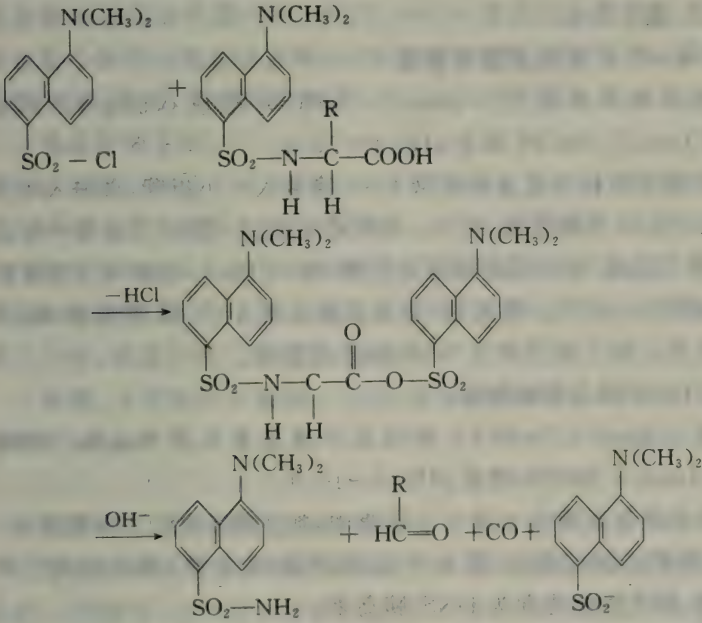
荧光试剂 DNS-Cl (二甲基氨基萘磺酰氯, 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl-chloride, 又称 Dansyl-chloride) 与氨基酸在 pH10 左右的碱性条件下作用形成一类称为 DNS-氨基酸的衍生物。这类衍生物在 254 或 365nm 的紫外光下可发出强烈的黄色荧光。DNS-氨基酸在酸性条件可被乙酸乙酯萃取出来,经聚酰胺薄膜层析后斑点集中,灵敏度达到 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ 克分子水平。

DNS-氨基酸相当稳定,在 6mol/L 的盐酸中,110℃,22 小时的条件下,除 DNS-色氨酸全部破坏,和 DNS-脯氨酸(77%)、DNS-丝氨酸(35%)、DNS-甘氨酸(18%)、DNS-丙氨酸(7%)部分破坏外,其余均很少破坏。

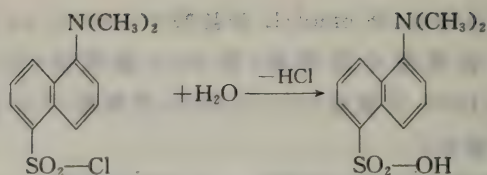
其反应过程如下:



当 DNS-Cl 多余时,反应继续进行,生成 DNS-NH₂。



当 pH 较高时,DNS-Cl 自身水解生成 DNS-OH。



与纸层析及纸电泳等方法相比,聚酰胺薄膜层析在分析氨基酸衍生物时具有灵敏度高,分辨力强,速度快,操作方便等优点。

二、试剂

DNS-Cl 溶液:取 25mg DNS-Cl 溶于 10ml 丙酮中。

0.2mol/L NaHCO_3 水溶液;6mol/L HCl,1mol/L NaOH;甲酸;苯;冰乙酸。

三、操作方法

1. DNS-标准氨基酸的制备

将标准氨基酸用 0.2mol/L NaHCO_3 配成 0.5mg/ml 的溶液,用 1mol/L NaOH 调至 pH9.8~10.0。

用滴管取标准氨基酸溶液 2~3 滴装入一小指管,再加入等体积的 DNS-Cl 丙酮溶液,摇匀。用胶布封住口,置 40℃温箱中保温 30 分钟。取出,电吹风热风蒸去丙酮,滴入 1mol/L 的 HCl 溶液酸化到 pH 2.0~2.5。酸化后,加入乙酸乙酯 4~5 滴,稍加摇动,小指管上层乙酸乙酯层即含 DNS-标准氨基酸。

2. DNS-胰岛素的制备

用 0.2mol/L NaHCO_3 将结晶牛胰岛素配成 2mg/ml 的溶液,用 1mol/L NaOH 调至 pH9.8~10.0。

取此胰岛素溶液 4 滴于小指管中,加 4 滴 DNS-Cl 丙酮溶液,摇匀。用胶布封住管口,置 40℃温箱保温 30 分钟。取出后真空抽去丙酮,剩余固体物即为 DNS-胰岛素。

3. DNS-胰岛素的水解及 DNS-氨基酸的提取

向含有 DNS-胰岛素固体物的小指管内,加入 0.2 毫升 6mol/L

HCl 溶液。在煤气灯上将管口封闭,置 110°C 烘箱水解 12 小时左右。水解后开管,真空抽干,加 2 滴 0.2mol/L NaHCO_3 溶液,再用 1mol/L 的 HCl 调至 $\text{pH}2.0\sim2.5$ 。然后加入乙酸乙酯 5~6 滴,稍加摇动,小指管上层的乙酸乙酯内含 DNS-胰岛素 N-末端氨基酸。

4. 点样和展层

取聚酰胺薄膜($7\times7\text{cm}$),距边 0.5cm 处作一直线为基线,基线上等距离画几个点,为点样品的位置。如果需作双向层析则按此距离画一交叉十字,在此交叉点上点样。

DNS-标准氨基酸、蛋白质水解液分别用毛细管取样,于聚酰胺薄膜上点样,样品斑点直径不超过 2 毫米。

展层:将聚酰胺薄膜的光面向外,聚酰胺面向内,箍以一个尼龙条圈或照相底片圈(用 1mol/L NaOH 液煮过),置于小干燥器或自制小钟罩内的小培养皿上,培养皿中盛有层析溶剂。展层 15~20 分钟,取出,用吹风机吹干。

展层溶剂系统:

a:甲酸(88%):水=1:1 (V/V)

b:苯:冰乙酸=8:2 (V/V)

测定末端基,一般单向展层即可,展层用甲酸-水的系统(a)。若进行双向展层,先用 b 系统做第一相,展层后取出,只需真空干燥一小时,就进行第二向(用 a 系统)。

检测:于紫外灯下观察。DNS-氨基酸呈黄色,DNS-OH 呈绿色荧光,画出图谱。

附录一 聚酰胺薄膜的制备

聚酰胺薄膜是将聚酰胺即锦纶原料涂在涤纶片基上以后所形成的一层薄膜(也可涂在玻璃片上,但不如涤纶片基便于操作和保存)。锦纶易溶于强酸,将锦纶溶于甲酸,成粘稠溶液,然后涂在涤纶片基上,当甲酸缓慢挥发后,即形成一层均匀紧密的多孔薄膜。

层析展层时,溶剂沿着细孔上升。如果锦纶浓度过高,细孔较少,展层速度慢。反之,浓度过低,膜质疏松,孔多,展层速度快,被分离物极易扩散。锦纶浓度一般以 20% 为宜。薄膜的厚度对层析分离及灵敏度的影响也很大,以 0.15 毫米左右的厚度为宜。锦纶原料的聚合分子量对膜的质量也有影响。聚合分子量大的原料,溶解后粘度大,制成的膜牢固紧密,层析时样品的点集中,扩散小。分子量过小的原料不适于制膜,因为制成的膜容易从片基上脱落,层析点易扩散。通常取分子量在 2 万左右的锦纶作为原料,制成的膜质量较好。

制膜方法:

1. 涤纶片基的处理

涤纶片基表面有苯丁树脂和油质,必须预先除去。将膜切成 17×35 厘米,浸入 10% 氢氧化钠水溶液与工业酒精[1 : 1(V/V)]混合液中过夜。用时取出,以清水洗净,直至表面不挂水珠为止。

将洗净的涤纶片基(厚度为 0.1 毫米左右)趁湿紧贴在玻璃板上,片基两侧贴上厚度为 0.4 毫米的聚氯乙烯条,待片基表面凉干后,将其置于通风橱内的水平木板上。木板必须用水平仪校至水平,只有这样才能保证膜的均匀。

2. 锦纶甲酸溶液的配制

在 100 毫升烧杯内,称取锦纶(湿切片,一级品)5 克,加甲酸(85%)25 毫升,盖上表面皿,电磁搅拌溶解,约 3 小时以后成透明清液。必要时可用砂芯漏斗减压过滤,除去难溶固体。

3. 铺膜

将锦纶甲酸溶液倒在水平木板上面的涤纶片基上,迅速推动架于片基两侧聚氯乙烯条上的玻璃棒,以使液体均匀铺在片基上。甲酸是极易挥发的腐蚀性酸类,需戴口罩和手套在通风橱内操作。膜铺好后,立即关闭通风橱,让甲酸缓慢挥发过夜,次日取出,在空气中吹干。不可用高温烘烤,否则易使膜变形和断裂。吹干后,将薄膜裁成所需大小。

✓ 酶的分离、提取和纯化

1. 酶的提取纯化的一般原则

对酶进行分离提纯有两方面的目的,一是为了研究酶的理化特性(包括结构与功能、生物学作用等),对酶进行鉴定必须用纯酶;二是作为生化试剂及用作药物的酶,常常也要求有较高的纯度。

根据酶在体内作用的部位,可以将酶分为胞外酶和胞内酶。前者是由细胞产生后分泌到细胞外进行作用的酶,这类酶大多是水解酶,如细菌产生的淀粉酶、蛋白酶,帮助消化的多酶片中的胃蛋白酶和胰蛋白酶都属于胞外酶。胞外酶易于分离,如收集动物胰液即可分离出其中的各种蛋白酶和酯酶等。胞内酶则是在细胞内合成后并不分泌到细胞外,而是在细胞内起催化作用,体内的大多数酶属此类,它们在胞内往往定位或结合于特定的亚细胞结构上,如三羧酸循环、脂肪酸氧化、呼吸链和氧化磷酸化等一系列与能量生成有关的酶系主要集中在线粒体上;与蛋白质合成的有关酶系主要分布在粗面内质网上;与糖酵解、糖原异生作用和脂肪酸合成等有关的酶系则主要集中在细胞液中,胞内酶的分离必须破碎细胞。

在生物组织细胞内含有各种各样的酶,要获得所需要的酶,必须将许多其它酶和蛋白质,以及各种杂质除去,进行分离、提取和纯化过程,操作时应注意:①在酶的提取纯化过程中防止酶的变性失活,避免过酸或过碱,保持在较低的温度下操作,防止重金属离子的毒害,防止有机溶剂的变性作用,抑制蛋白水解酶的作用;②因为酶是蛋白质,因此凡是能用于蛋白质分离纯化的一切方法同样适用于酶;③酶是具有催化活性的蛋白质,可以通过测定酶的催化活性,跟踪酶在分离提纯过程中的去向,并为选择最佳方法和操作条件提供直接的依据。在整个酶的分离纯化过程中,每一步骤都需要进行酶的活力测定,这样才能知道经过某一步骤回收多少酶、纯度提高了多少,从而决定该步的取舍。

酶的分离纯化一般包括三个基本步骤:抽提、纯化、结晶或制剂。

(1)酶的抽提:目的是将尽可能多的酶和尽可能少的杂质从原料中引入溶液。①预处理和破细胞。无论是动植物或是微生物材料都要进行预处理,如动物材料须去除脂肪,油料种子先用乙醚等有机溶剂进行脱脂,微生物材料则是将菌体从发酵液中分离出来。经过预处理的材料应以尽可能的新鲜状态直接应用或立即冷冻低温保藏。胞外酶一般不需要破细胞,可直接用水或缓冲液浸泡,滤去不溶物,就可得到酶的粗抽提液。胞内酶则需破细胞后才能释放出来,动植物组织细胞一般用高速组织捣碎器或加砂研磨或匀浆器破碎,以有利于下一步处理。也可继续制成丙酮粉或反复进行冰冻融解处理等。微生物材料可采用超声波破碎或加溶菌酶或丙酮干粉法或菌体自溶法等(丙酮干粉法是将新鲜材料粉碎后在低于 0°C 的条件下加入5~10倍量的低温预冷的丙酮,迅速搅拌均匀后过滤、低温干燥和粉碎即得丙酮干粉;②抽提。由于大多数酶属于球蛋白类,因此一般可用稀盐、稀酸或稀碱的水溶液进行抽提,但选择什么抽提液和抽提条件则取决于对酶的溶解和稳定性有利与否。通常抽提液的pH值以4~6为宜,所选择的pH值应在该酶的稳定范围之内,并且能远离其等电点。对于盐的选择,因为大多数蛋白质在低浓度的盐溶液中溶解度大,故抽提时一般采用等渗盐溶液,常用的有 $0.02\sim 0.05\text{mol/L}$ 磷酸缓冲液和 0.15mol/L 氯化钠,此外焦磷酸钠和柠檬酸钠缓冲液还具有螯合某些金属离子的作用,抽提的温度通常在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 范围内。抽提液的用量通常是原料的1~5倍。有时须反复抽提以提高效果;③浓缩。由于抽提后的酶液或发酵液中酶的浓度很低,需加以浓缩利于下一步处理。浓缩的方法有用盐或冷乙醇沉淀后再溶解,薄膜浓缩、冰冻浓缩、聚乙二醇浓缩,凝胶过滤浓缩和超过滤浓缩法等。

(2)酶的纯化:其目的主要是除去包括杂蛋白在内的众多杂质,获得所需纯酶。在酶的粗抽提液中除目标酶以外还混杂有其它

许多小分子和大分子物质。小分子物质在纯化过程中很容易去除，必要时可用透析法。大分子中有杂蛋白、核酸和糖类，核酸可用加氯化锰或鱼精蛋白等加以沉淀而除去，必要时可用核酸酶。粘多糖可用醋酸铅、乙醇和丙酮等处理。而杂蛋白是主要的杂质，根据酶蛋白与杂蛋白在物理化学和生物化学性质的差异可用如下一些方法除去杂蛋白：①根据溶解度的不同来纯化酶的方法有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法和选择性沉淀法；②根据酶和杂蛋白分子大小的差别来纯化酶的方法有凝胶过滤法等；③根据带电性质纯化酶的方法有离子交换层析法、电泳分离法和等电聚焦层析法；④根据酶和杂蛋白在某些条件下的稳定性差别来纯化酶的选择性变性法；⑤根据酶和底物、辅助因子或抑制剂之间的专一性亲和作用建立起的亲和层析法。

因为酶是生物活性物质，在提纯时必须考虑尽量减少酶活力的损失，整个操作要在低温下进行，一般在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 之间，使用有机溶剂分级分离时要在 $-15\sim -20^{\circ}\text{C}$ 下进行。此外加入 EDTA 螯合剂可防止重金属引起的失活，加入巯基乙醇可防止 $-SH$ 氧化引起的失活，并且整个操作不能过度搅拌，以免产生大量泡沫使酶变性。

(3)酶的保存：最后需将获得酶制品浓缩、结晶以便于保存，无论是粗酶制剂还是纯酶制剂，是液体的还是固体的酶制剂都存在一个如何保存或提高酶稳定性的问题。大多数酶在低温条件下 ($0\sim 4^{\circ}\text{C}$) 保存，少数酶可在 -20°C 下保存。保存时尽量以高浓度的酶方式，低浓度易失活，这是方式 1，即保存浓缩的酶液。为提高酶的稳定性，可加入某些稳定剂如底物、巯基保护剂和某些无机离子，常用的巯基保护剂如谷胱甘肽、二巯基乙醇和二巯苏糖醇 (DTT) 等，无机离子如 Ca^{2+} 能保护 α -淀粉酶， Mn^{2+} 能稳定溶菌酶， Cl^{-} 能稳定透明质酸酶等。此外还可利用血清白蛋白作保护剂。固体酶制剂的稳定性较高，在暗冷下保存数日至一年以上不失活，这是保存方式 2，即冰冻干燥法。近年来也常用甘油和蔗糖作低温

保存添加剂,这是方式3,即浓缩液加入等体积甘油保存法。

2. 酶纯度的测定

酶提纯的目的不仅要求酶量得率高,而且更要求得到不含或少含其它杂蛋白,使酶的纯度提高。因此在酶的纯化过程中要跟踪检查酶的含量和存在,除了测定一定体积或一定重量酶制剂中含有的酶活力单位数之外,还要测定酶制剂中蛋白质(或蛋白氮)的含量,以求得酶的纯度。酶的纯度用比活力表示。根据国际酶学委员会规定,比活力用每毫克蛋白质(或蛋白氮)所含的酶活力单位表示,比活力愈大,表示酶的纯度愈高。

$$\text{比活力} = \text{活力单位数} / \text{毫克蛋白(氮)}$$

$$= \text{总活力单位数} / \text{总蛋白(氮)毫克数}$$

而一个酶活力单位的定义是指在特定条件下在1分钟内能转化1微摩尔(μmol)底物的酶量,或是转化底物中1微摩尔的有关基团的酶量。特定条件:温度选定为 25°C ,其它条件(如pH和底物浓度)均采用最适条件。这是标准定义,但实际工作中也经常采用习惯定义。

此外在酶的纯化工作中还要计算纯化倍数和产量%(即回收率)。

$$\text{纯化倍数} = \frac{\text{每次比活力}}{\text{第一次比活力}}$$

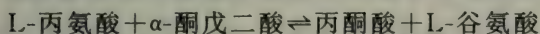
$$\text{产量}\% = \frac{\text{每次总活力}}{\text{第一次总活力}} \times 100\%$$

酶的纯度鉴定目前采用较多的是聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳法。

实验三十一 丙氨酸转氨酶活性的测定

一、原理

转氨酶催化氨基移换反应。丙氨酸转氨酶催化如下的反应：



若此反应与乳酸脱氢酶催化的反应相偶联，可以使生成的丙酮酸转变成乳酸：



在该反应中，NADH 可以定量地转变成 NAD^+ ，也使丙酮酸定量地转变成乳酸。因而 NADH 在 340nm 处的吸光度变化可以用来表达酶活性的高低。

二、试剂

- ① 0.05mol/L、pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液；
- ② NADH: 3mg/ml, 用①配制；
- ③ L-丙氨酸: 0.2mol/L, 用①配制；
- ④ α -酮戊二酸: 0.05mol/L, 用①配制；
- ⑤ 乳酸脱氢酶: 每 ml 含 20000 单位。

三、操作方法

1. 丙氨酸转氨酶粗酶液的制备

取 20g 洗净的白菜叶，加入 0.5 倍体积的 0.05mol/L、pH7.2

冰冷的 Tris-HCl 缓冲液, 研磨、匀浆, 匀浆液于 4°C 以下 $26000\times g$ 离心 20 分钟。上清液即为粗酶液。

2. 酶活性的测定

取 0.2ml NADH、0.5ml L-丙氨酸、0.1ml 含 2000 单位的乳酸脱氢酶、0.2ml 的 α -酮戊二酸盐、水 1.8ml 和 0.2ml 粗酶液。终体积 3ml, 混匀后于 22°C 保温 10 分钟, 于 340nm 测定光吸收。以不加丙氨酸的反应液作对照。

酶活性以每分钟转化 $1\ \mu\text{mol}$ 的 NADH 所需的酶量为一个活性单位。酶的比活性以每分钟每 mg 蛋白所形成的 NAD^{+} 量表示。

实验三十二 蛇毒磷酸酯酶的底物专一性实验

一、原理

磷酸酯酶也叫磷酸水解酶,是分布广泛的酶,按酶作用的最适 pH 可以粗略地分为三类,①酸性磷酸酯酶(最适 pH 范围为 4.8~6.5);②中性磷酸酯酶(最适 pH 范围为 6~8);③碱性磷酸酯酶(最适 pH 为 8.6~10.3),很明显这种分类法并不严格。磷酸酯酶的第二种分类法将其分为磷酸单酯酶和磷酸二酯酶两类,其依据是磷酸化底物的化学本质。如:葡萄糖-1-磷酸和果糖-1,6-二磷酸属单酯键,而 cAMP 和磷脂酰胆碱(卵磷脂)均属双酯键,有关化学式可参看教材。

果糖-1,6-二磷酸经专一性碱性磷酸单酯酶催化水解产生果糖-6-磷酸。而普通的糖单磷酸酯不能作为果糖-1,6-二磷酸酶的底物。相反,葡萄糖-1-磷酸能被众多的非专一性磷酸酯酶水解。

一般地,磷酸二酯酶的专一性相当高,以磷脂酰胆碱为例,其中有两种类型的二酯酶。磷脂酶 D(有几种)产生磷脂酸和自由的胆碱;而磷脂酶 C(也有几种)则产生二酰甘油和磷酸胆碱。将 cAMP 转化成 5'-AMP 的磷酸二酯酶也具有高度专一性。甲基黄嘌呤类,如咖啡因,就是这类磷酸二酯酶的良好抑制剂。注意磷酸二酯酶只断裂一个键,而不释放无机磷酸,磷酸单酯酶则释放无机磷酸。

在生物系统内广泛分布着磷酸化化合物,它们或作能量贮存形式(如 ATP,磷酸肌酸等),或作信息大分子的组分(即 dNTP),

或作某些酶的别构效应因子(如果糖-1,6-二磷酸、磷酸烯醇式丙酮酸等),或作为“第二信使”(如 cAMP、cGMP、肌醇磷酸)。受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶控制的蛋白质磷酸化-去磷酸化反应调节着某些酶的活性(如磷酸化酶、丙酮酸脱氢酶等)。因此从众多组织中抽提出来众多的磷酸酯酶是合乎情理的。在胞外或体液,如牛奶、血浆、血清,甚至于尿液和动物毒液中可发现很多的磷酸酯酶,这些磷酸酯酶就其底物而言没有专一性,血液中磷酸酯酶的活性测定是一种很有价值的诊断工具。

本实验是有关响尾蛇毒液中的磷酸单酯酶,及一系列潜在底物(包括某些核苷酸、核苷酸磷酸、单糖磷酸酯)的实验。

二、试剂

含 Mg^{2+} 缓冲液:0.2mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, pH9.0, 含 20mmol/L MgCl_2 。

潜在底物:均用水配成 0.25mmol/L, 并调 pH 在 6~8 范围, 底物包括:2'-AMP、3'-AMP、5'-AMP、5'-UMP、6'-dTTP、葡萄糖-1-磷酸、葡萄糖-6-磷酸、5'-ATP。

蛇毒液:取自 *Crotalus adamanteus* 的冻干毒粉用水配成 10mg/ml, 然后于 $10000 \times g$ 离心 15 分钟 (4°C) 去混浊, 再用冰水稀释 200 倍。用前配制并冰浴保存。

磷酸分析试剂:1.8mol/L H_2SO_4 。

3.5% 钼酸铵:用水溶解后加几滴浓硫酸轻微酸化, 这有助于防止钼酸铵水解, 溶液应清亮。

乙基-对-氨基苯酚用 2.1% NaHSO_4 配成浓度为 0.7%, 此为还原剂。

无机磷酸标准液:用水将 KH_2PO_4 配成 0.250mmol/L。

三、操作方法

1. 无机磷测定的标准曲线

取试管编号,加无机磷酸标准液 0,1.0,2.0,3.0,4.0ml,然后用水将所有试管补足到 4ml,再向各管加 1.8mol/L H_2SO_4 1ml,钼酸铵溶液 1.0ml 和还原剂 1.0ml,每加一种试剂均需彻底摇匀,在室温下将所有试管放置 20 分钟,然后于 660nm 下调整分光光度计零点并读 A_{660} 。

2. 单磷酸酯的酶促水解

取试管编号,1~18 号,向各管加 1.0ml 含 Mg^{2+} 缓冲液,再按下表加各种潜在底物 2.0ml。

试管编号	待加溶液(底物)
1,2	水(作为无底物对照管)
3,4	2'-AMP
5,6	3'-AMP
7,8	5'-AMP
9,10	5'-UMP
11,12	6'-dTTP
13,14	葡萄糖-6-磷酸
15,16	葡萄糖-1-磷酸
17,18	5'-ATP

向各奇数编号试管加 1.0ml 水,这些作为无酶对照;向各偶数编号试管加 1.0ml 预冷的稀释蛇毒液。

将所有试管于室温放置 30 分钟,然后加 1.0ml 1.8mol/L H_2SO_4 ,终止酶反应,准备进行磷酸分析。立即取 1.0ml 钼酸铵溶液和 1.0ml 还原剂加入到各管中,每加一种试剂均需彻底摇匀,再于室温放置 20 分钟,最后于 660nm 下读各管的 A_{660} (1、2 号为空白对照)。

3. 核苷酸的酸水解

取 2 支试管各加 3.0ml 水,向第一支试管加 1.0ml 5'-AMP 溶液,向第 2 支试管加 1.0ml 5'-ATP,再加 1.0ml 1.8mol/L H_2SO_4 ,混匀,将两支试管在沸水浴中保温 10 分钟,取出试管后置于盛有冷水的烧杯中冷却到室温。加 1.0ml 钼酸铵和 1.0ml 还原剂,同前操作,放置 20 分钟后测 A_{660} 。

四、计算

以 A_{660} 对溶液中无机磷量 ($\mu\text{mol Pi/ml}$) 作标准曲线图。

在步骤 2 中的 A_{660} 要作校正,有两个空白管可用,因为蛇毒液中也无机磷存在的可能。

五、思考题

1. 从你的结果分析此酶的专一性。
2. 以 5'-AMP 的水解为基点,计算每分子 ATP 中的酸不稳定磷酸基团数目。
3. 从磷酸酐键相对于磷酸单酯键较稳定的现象可得出什么样的结论?
4. 假若以蛇毒磷酸酯酶水解程度最高的化合物为最适底物,稀释的蛇毒磷酸酯酶的比活力如何(以 $\mu\text{mol/min/mg}$ 蛋白表示)?

实验三十三 碱性磷酸酯酶的定性实验

一、原理

碱性磷酸酶能水解磷酸酯键,具有相对专一性。其作用 pH 值在碱性范围内,对热较稳定。

该酶的亚基分子量在 40000 左右,可形成二聚体或四聚体,单体无活性。分子中含有的锌原子是维持其活性所必需的,属丝氨酸酶类。金属螯合剂可去除锌离子而使酶失活,该酶在 6mol/L 尿素存在下,被硫醇作用产生可逆变性。一些金属离子如 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等对酶有激活作用,氰化物和焦磷酸盐是其抑制剂。

本实验以酚酞二磷酸为底物,经该酶水解可释放出酚酞,而酚酞在碱性环境中呈红色,极易肉眼观察。实际测活时常用对硝基酚磷酸作底物进行比色测定。

二、试剂

碳酸盐缓冲液(pH10): 5.8 g Na_2CO_3 和 3.8g $NaHCO_3$ 溶于 1 升蒸馏水中。

碱性磷酸酶溶液: 10mg 酶溶于 10ml 缓冲液中,新鲜配制。

含抑制剂的酶液: 240mg 柠檬酸钠溶于 4ml 新配制的酶液(抑制剂浓度为 0.2mol/L)。

酚酞二磷酸溶液(0.1mol/L): 280mg 溶于 5ml 缓冲液中,新鲜配制。

激活剂:2mol/L 乙酸镁,2g 乙酸镁(含 4 分子结晶水)用 5 ml 缓冲液溶解即成。

抑制剂:2mol/L 柠檬酸钠溶液,将 3g 柠檬酸钠溶于 5 ml 缓冲液。

三、操作方法

1. 取 5 支大试管(24mm×150mm)按下表加试剂:

管号	1	2	3	4	5
缓冲液(ml)	10	9	9	8	10
激活剂(ml)	—	1	—	1	—
抑制剂	—	—	1	1	—
酶液(2ml)	新鲜酶液	新鲜酶液	含抑制剂的酶液	含抑制剂的酶液	热处理酶液
底物(酚酞二磷酸液)(ml)	1	1	1	1	1

注:反应中 3,4,5 号试管所加的酶液应进行预处理,10ml 酶液各取 2ml 均各装入一透析袋中,密封两端进行透析。其中一个透析袋置于沸水浴中透析 10 分钟,冷却后置于 5 号管中。

四、结果处理

按照表格内容反应后记录下各试管的颜色,解释原因。

五、思考题

1. 说明激活剂和抑制剂的概念和分类。
2. 实验中管 1,4,5 各有何用意?

附:透析袋的处理

- (1)将透析袋剪成合适长度(一般为 10~20cm);

(2)在大量 2%碳酸氢钠和 1mmol/L EDTA 溶液中煮沸 10 分钟;

(3)在蒸馏水中彻底洗净透析袋;

(4)在蒸馏水中煮 10 分钟,冷却后贮放在 5℃,一定要使透析袋经常浸没在水中;

(5)使用前用蒸馏水清洗透析袋内外,一定要带手套处理透析袋。

实验三十四 硫醇蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶的激活和抑制

一、原理

蛋白水解酶类可分为四类：丝氨酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。它们水解底物的速率取决于被水解肽键的 N-侧和 C-侧氨基酸的理化性质。

丝氨酸蛋白酶的特征是其活性部位有高活泼性的丝氨酸残基存在，该丝氨酸可与有机磷化合物（如 DFP、二异丙基氟磷酸）形成共价键而引起不可逆抑制。

硫醇蛋白酶的特征是活性中心的硫醇基的存在，该硫醇基可与烷基化试剂，如碘乙酰胺，形成共价键而引起不可逆抑制。

天冬氨酸蛋白酶的特征是两个活性部位的天冬氨酸残基的存在，其一可被活性专一的重氮化合物所标记，另一个可被环氧化合物所标记。不管其中哪个残基被标记均会引起失活。这类蛋白酶的大多数（不是全部）具有非常低的最适 pH 值（如胃蛋白酶），所以以前也叫做酸性蛋白酶。

金属蛋白酶的特征则是有重金属离子直接参与了催化过程。螯合剂可使这类酶的活性丧失。

本实验是基于以下原理进行的。正常情况下酪蛋白（牛奶中的主要蛋白成分）是以分子团存在的，用适当的蛋白酶对其进行消化，酪蛋白则可释放出糖多肽而使自身的分子团稳定性遭到破坏。被消化了的酪蛋白分子凝聚成较大的块，最终形成凝乳。不

过，牛奶的凝块过程只能被某些蛋白酶所揭示，如硫醇蛋白酶：木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶；天冬氨酸蛋白酶：胃蛋白酶和精液酸性蛋白酶。本实验利用牛奶凝结分析来研究菠萝汁的菠萝蛋白酶的可逆性抑制与不可逆抑制；人精液酸性蛋白酶的激活和失活，以及研究肉松中蛋白酶活性的存在。

二、试剂

天然牛奶和低脂牛奶、新鲜菠萝、肉松、人精液或精子、含酶片剂；

0.5 mol/L 醋酸钠缓冲液，pH5.5；

0.2 mol/L 半胱氨酸溶液或 0.2 mol/L 巯基乙醇溶液或 H_2S 水溶液；

0.2 mol/L EDTA 二钠盐溶液；

0.05 mol/L 碘乙酸或碘乙酰胺；

0.05 mol/L HgCl_2 ；

0.25 mol/L NH_4OH ；

0.25 mol/L HCl ；

研钵、尼龙布、离心机、分光光度计。

三、操作方法

1. 材料处理

①新鲜菠萝汁的制取：将 30 克菠萝块用尼龙布包好后小心挤压，所得榨汁作酶贮存液。②肉松酶的制取：称取 10 克肉松置于量筒中，再加蒸馏水使其体积到 20 毫升，充分混匀，然后放置，弃沉淀，上清液作为酶贮存液保存。③人精液的处理：用 7 倍体积的蒸馏水将精液稀释，作酶贮存液。④含酶片剂的处理：取一粒片剂于研钵中，加 7ml 水，碾匀，然后将其转移到离心管中离心或放置，上清液即为酶贮存液。

2. 分析方法

(1)凝块形成的肉眼观察法:取 0.5 ml 酶液于试管中,再按规定步骤温育。加 5 ml 的天然牛奶或低脂牛奶溶液,混匀。15 分钟后,缓慢倾斜试管,注意观察粘度的明显增加,以此来检查半固体凝块的形成。

(2)凝块形成的分光光度测量法:稀释的牛奶底物反应液按下述步骤准备。先用 0.5 mol/L 醋酸钠溶液(pH5.5)制成 0.1 mol/L 的缓冲液,在 98ml 的 0.1mol/L 醋酸钠溶液中加入 2ml 低脂奶液,此过程要缓慢,使后者充分地弥散。每次测定时,取该稀释的底物溶液 4.5ml 于比色杯中,并以此液作空白进行调零点,波长选用 500nm,以加入 0.5ml 预温育的酶液到空白体系时作为零点开始计时,记下该波长(500nm)条件下的光吸收值达 0.30 时的时间(t),活力用 $1/t$ 表示。为了节约时间,如果酶液在 5 分钟内的反应后,光吸收值没有达到 0.30,可看做活力为零。

3. 菠萝蛋白酶浓度影响实验

(1)取 6 支试管编号,在管 1 和管 2 中加入 0.5 ml 菠萝蛋白酶贮存液,在管 2 到管 6 的 5 支试管中加入 0.5 ml 水,将 2 号管混匀后转移 0.5ml 到 3 号管中,再将 3 号管混匀并转移其中的 0.5ml 到 4 号管中。按此方法一直到第 6 号试管,最后将 6 号管中的 0.5ml 弃去不要。这样 6 支试管中的酶液浓度依次是 1,1/2,1/4,1/8,1/16 和 1/32。

按前述的分析方法,以空白管作零,对每支试管中的酶活力进行测定。记录下结果,如果用分析方法(1),结果用“+”或“-”号表示凝块形成是否;如果用分析方法(2),结果以 $A_{500}=0.30$ 的所需时间(t)(秒)来表示。

(2)实验结果和思考题

①试验结果

管号	空白管	1	2	3	4	5	6
酶浓度	0	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
底物	按前述加入牛奶底物,温育						

分析法(1)

分析法(2)的时间(t)

②用分析法(1)时能给出“+”结果的最大酶稀释度是多少?如果试管温育时间为 30 分钟,你预计将会出现什么样的结果?

③用分析方法(2),酶活力($1/t \text{ 秒}^{-1}$)对酶浓度作图,所得图是否为直线?请解释。

④若在奶液上加醋则会产生沉淀,为什么?你的试验中看到的凝块现象是因为酶作用的结果还是因为菠萝汁的酸作用结果?如果是前者,你怎样用一简单试验证实之?

4. 菠萝汁中硫醇蛋白酶的抑制实验

(1)根据实验 3 中的结果,选择一个适当的酶浓度用于本实验的操作。取 6 支试管,加入 0.5 ml 适当浓度的酶液,然后在管 1 和管 2 中加 0.1ml 的水,在管 3 和管 4 中加 0.1ml 的 0.05mol/L HgCl_2 ,在管 5 和管 6 中加 0.1ml 的 0.05mol/L 碘乙酸液,摇匀,保温 10 分钟。再向偶数号试管中加入 0.4ml 的水,向奇数号试管中加入 0.2ml 的 0.2mol/L EDTA 和 0.2ml 的 0.2mol/L 半胱氨酸溶液。摇匀,温育 15 分钟,最后按前述分析方法测定每支试管中的凝块活力。

(2)实验结果处理及思考题

① HgCl_2 抑制菠萝汁中的蛋白酶活力吗?抑制是不是可逆的?请解释。

②碘乙酸抑制菠萝汁中的蛋白酶活力吗?抑制是不是可逆的?请解释。

③菠萝汁中的蛋白酶活力是否有部分非活性状态存在?

5. 精液中酸性蛋白酶的激活与抑制实验

(1)取 7 支试管,向其中各管加入稀释 8 倍的精液 0.5ml,向 1 号管中加 0.1ml 水,向 2,3 和 4 号管加 0.25mol/L HCl 0.1 ml(使其终 pH 约为 2.5),向管 5 和管 6 中加 0.1 ml 的 0.25 mol/L

NH_4OH (使其终 pH 约为 9), 向管 7 中加 0.1 ml 的 0.2 mol/L 半胱氨酸和 0.1 ml 的 0.2 mol/L EDTA。摇匀, 温育 10 分钟, 再向管 3 中加 0.3 ml 的 0.25 mol/L NH_4OH (使其终 pH 约为 9), 向管 4 中加 0.2 ml 的 0.05 mol/L 碘乙酸, 向管 5 中加 0.4 ml 的 0.25 mol/L HCl (使其终 pH 约为 2.5), 最后向每支试管补足水, 使其终体积为 1.0 ml, 摇匀, 温育 15 分钟, 最后向每支试管加 0.5 ml 的 0.5 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5), 并测定凝块活力。

(2) 实验结果及思考题

① 精液中含菠萝蛋白酶样的硫醇蛋白酶还是含胃蛋白酶样的蛋白酶? 请解释。

② 精液中的蛋白酶是以非活性状态存在吗? 如果是, 怎样被激活?

③ 非活性态酶和活性态酶是怎样反映碱性条件的? 请解释。

④ 你的试验表明精液中只有单一类型的蛋白酶存在吗?

6. 商品中蛋白酶活力的存在实验

(1) 取 5 支试管, 各加 0.5 ml 的酶贮存液 (每种商品均做一次测试)。向管 1 中加 0.2 ml 水, 向管 2 中加 0.1 ml 的 0.2 mol/L 半胱氨酸和 0.1 ml 的 0.2 mol/L EDTA, 向管 3 中加 0.2 ml 的 0.05 mol/L 碘乙酸, 向管 4 中加 0.15 ml 的 0.25 mol/L HCl (终 pH 约为 2), 向管 5 中加 0.15 ml 的 0.25 mol/L NH_4OH (终 pH 约为 9), 摇匀温育 15 分钟, 再向每支试管加 0.5 ml 的 0.5 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5), 并测定各管的凝块活力。

(2) 实验结果及思考题

① 何种样品中含菠萝蛋白酶型的硫醇蛋白酶? 请解释。它是以活性状态或是非活性状态存在。

② 何种样品中含有与胃蛋白酶行为相似的蛋白酶? 请解释。又以何种状态存在? 你能用什么实验证实该蛋白酶属于天冬氨酸蛋白酶还是属于酸性蛋白酶?

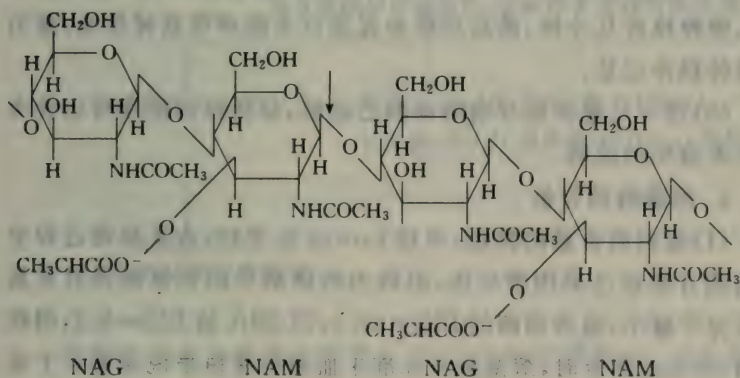
③ 何种样品没有凝块活力? 你能得出它不含蛋白酶这样的结论吗?

实验三十五 从鸡蛋清中制备溶菌酶

一、原理

溶菌酶(E. C. 3. 2. 1. 7)是糖苷水解酶,由 129 个氨基酸残基组成,在蛋清中其含量丰富,从一个鸡蛋中可获得 20mg 左右的冻干酶。在蛋清中除溶菌酶以外还有其它许多蛋白质,但溶菌酶有两个显著的特点:一是具有很高的等电点, $pI=11.0$,二是其分子量低, $Mr=14.6 \times 10^3$,借此可以将它从蛋清中很容易地分离出来。

溶菌酶之所以溶菌,是因为它能催化革兰氏阳性细菌的细胞壁肽聚糖水解,见下图:



测定溶菌酶活力时,可用某些细菌细胞壁作底物,以单位时间内被它水解的细胞壁的量表示酶活力的大小。

二、试剂

鸡蛋,微球菌(*M. lysodeikticus*)

0.1 mol/L Gly-NaOH 缓冲液(pH10.0)

含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Gly-NaOH 缓冲液 pH10.0

0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6.24

CM-纤维素

Lowry 试剂(参见实验 16)

小层析柱(1×15cm)

三、操作步骤

1. 从鸡蛋清中分离溶菌酶

蛋清用纱布过滤后,取 20ml 用 0.1 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH10.0)稀释 5 倍。

(1)将 1 或 2 只鸡蛋的蛋清置于小烧杯中(轻敲蛋壳成一小孔,从中放出蛋清即可)(蛋清的 pH 不得低于 pH8.0,否则不能用),慢慢搅拌几分钟,然后用纱布过滤以去除卵带或碎蛋壳,量出蛋清体积并记录。

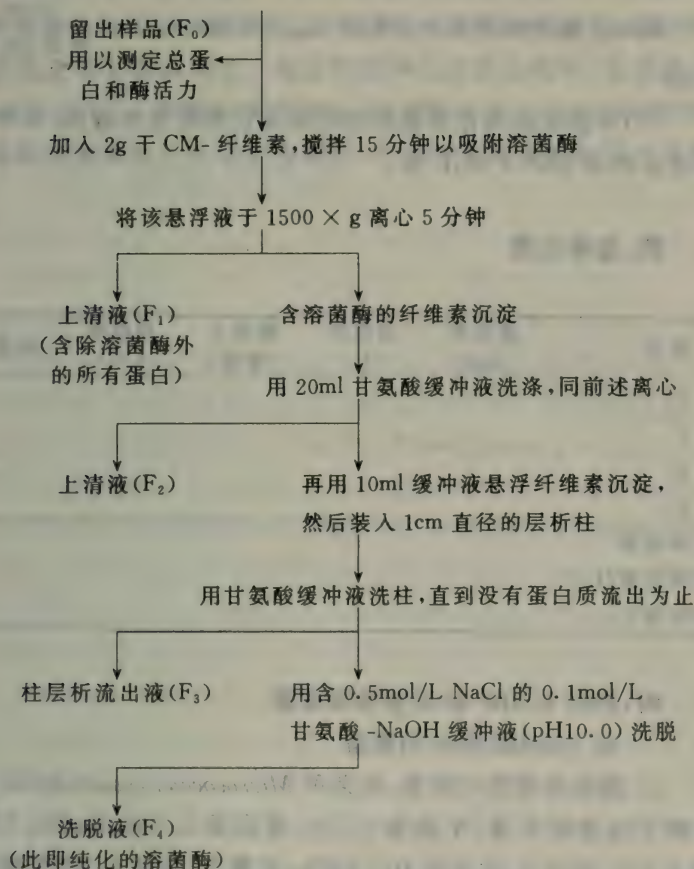
(2)对一只蛋来说分离溶菌酶已足够,层析柱的使用可以参考有关实验中的说明。

2. 溶菌酶的分析

(1)蛋白质含量的测定,可按 Lowry 法进行,为了分离过程中的监测方便也可采用紫外法,但因为溶菌酶中的色氨酸相对含量高且分子量小,故溶菌酶的 $E_{280}^{1\%} = 26.4$,而 BSA 的 $E_{280}^{1\%} = 6.2$,因此在用 280nm 测定时,溶菌酶对标准牛血清白蛋白来说应有一个系数 4。

(2)溶菌酶活力测定:取干菌粉(*M. Lysodeikticus*)用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制(pH6.24),以 20mg 干粉/100ml 为宜,此时悬浮的光密度值应在 0.5~0.7 范围内。

取干酶粉用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.24) 配成 1mg/ml。



将酶液和底物悬液分别置于 25 °C 水浴中保温 10~15 分钟, 然后吸取底物悬浮液 3ml 置比色杯中, 比色测定 A_{450} , 此时为零时读数。然后加入酶液 0.2ml (10 μ g 酶), 迅速摇匀, 从加入酶液起计时, 每隔 30 秒测一次 A_{450} , 共测 3 次 (90 秒)。

酶活力的定义为: 每分钟 A_{450} 下降 0.001 为一个活力单位

(25 °C, pH6.2)。

计算:

$$\text{每 mg 酶的活力数} = (\text{零时 } A_{450} - 60 \text{ 秒 } A_{450}) \times \frac{1000}{\text{样品 } \mu\text{g 数}} \times 1000$$

(3)所获得的纯化溶菌酶也可用其它方法加以验证:如等电聚焦电泳法和 SDS-PAGE 法。

四、结果处理

组分	蛋白质 (mg)	回收率 (%)	酶活力 (单位)	回收率 (%)	比活力
F ₁					
F ₂					
F ₃					
F ₄					
总回收量					
起始总量(F ₀)					
回收率 c%					

附:艳红 K-2BP 标记溶性微球菌

M. lysodeikticus 的制备

1. 菌体的培养与收集:取菌种 *Micrococcus lysodeikticus* 634, 接种于肉汤培养基(牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1.0%、NaCl0.5%、琼脂 2.5%、pH7.5,压力为 103.4kPa,灭菌 15 分钟)。37 °C 培养 48 ~ 72 小时后收集菌体,先用蒸馏水后用丙酮反复洗涤,最后用乙醚处理,可得到干燥菌体。

2. 艳红 K-2BP 标记溶性微球菌 *M. lysodeikticus*:取干燥菌体 5 克,加入 50 毫升 1.25 mol/L NaOH,再加 2.5 克活性染料艳红 K-2BP(上海染化八厂生产)搅拌均匀,于 25 °C 水浴放置 24 小时进行染色后,3000rpm 离心 10 分钟收集红色菌体。染色菌体反复

用蒸馏水洗涤并离心,以尽量除去未参加反应的游离染料,必要时再用强碱性 711 树脂在搅拌下进行处理(树脂处理成 Cl^- 型, $\text{pH}7$, 树脂的湿重量约为染色菌体的 50 倍),除去未能洗尽的游离染料,反复处理直至上清液无色。由此得到净化的染色菌体,直接悬于 0.5mol/L , $\text{pH}6.5$ 磷酸盐缓冲液内,制成浓度为 1% 的底物溶液。或者将染色菌体冻干或制成丙酮粉,使用时再用磷酸盐缓冲液配制。

实验三十六 亲和层析法分离 乳酸脱氢酶

一、原理

亲和层析(affinity chromatography)是在一种特制的具有专一吸附能力的吸附剂上进行的层析。又称为功能层析(function chromatography)、选择层析(selective chromatography)和生物专一吸附(biospecific absorption)。生物大分子具有与其相应的专一分子可逆结合的特性,如酶的活性中心或别构中心能通过某些次级键与专一的底物、抑制剂、激活剂和辅助因子相结合,并且结合后可在不丧失生物活性的情况下用物理或化学的方法解离。生物大分子和配基之间形成可解离的络合物的能力称为亲和力,抗体与抗原、激素与其受体、核糖核酸与其互补的脱氧核糖核酸之间均具有这种类似的亲和结合特性。根据这些生物分子间的可逆的结合和解离原理,建立和发展了亲和层析。首先是层析柱的准备,如将酶的底物或抑制剂(称其为配体)与固体支持物(称之为载体)通过化学方法连接起来便制成了专一吸附剂,然后将吸附剂装入柱中,再将含酶样品溶液通过该层析柱,在合适的条件下该酶便被吸附在层析柱上,而其它蛋白质不被吸附而全部通过柱流出,最后将该柱用合适的缓冲液洗脱,该酶又被解离而被淋洗下来,收集流出液可得到该酶的纯品。

亲和层析的吸附剂制备应注意以下几个问题:①选择合适的配基,这是实验成败的关键。②载体的选择,目前有琼脂糖凝胶和

交联琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶(GCA)、纤维素和多孔玻璃等载体种类,其中较为理想和广泛使用的是珠状琼脂糖。③将载体活化。④配基和活化载体进行偶联反应形成共价键,从而使配基接到载体上。由于载体性质不同,活化和偶联方法也不同。多糖类载体亲和吸附剂的制备方法有:溴化氢活化及偶联法、双环氧活化及偶联法和高碘酸盐活化及偶联法。聚丙烯酰胺载体的酰胺键活化方式有:羧基衍生物、酰肼衍生物和氨基衍生物的产生,然后再连接配基。

亲和层析的主要影响因素有:样品体积、柱流速和温度。

其应用范围很广,如酶和抑制剂的纯化、抗原和抗体的纯化、结合蛋白的纯化、激素受体的纯化以及分离纯化细胞等。

乳酸脱氢酶(LDH)是催化丙酮酸和乳酸可逆转换的酶,属四聚体酶,每个四聚体都是由两个亚基类型(M和H型)的不同组合,总共形成五种同功酶(M_4 、 M_3H 、 H_2M_2 、 MH_3 、 H_4),它们的电泳行为彼此不同。LDH的活性可以通过丙酮酸的减少或乳酸的产生而测定,但这些物质的测定既繁琐又困难,所以一般都是利用另一种更方便的方法,即辅底物 $NAD^+/NADH$ 的测定,在 340nm 下 $NAD(P)H$ 的摩尔消光值 $= 6.22 \times 10^3$ (1cm 光径),而同样情况下 $NAD(P)^+$ 的摩尔消光值可以忽略不计。在众多的脱氢酶分析时都是基于这个道理而进行快速而灵敏的比色分析的。

本实验是这样安排的:在鸡胸肌中含有丰富的 LDH,其抽提物可用亲和层析柱分离纯化。该柱用琼脂糖作层析基质,在琼脂糖上共价连接有 Cibacron 蓝, FeGA, 也叫做活性蓝,该配体与吡啶核苷酸的形状和电荷性质类似,因此它作为固定组分与核苷酸互补,在其周围被酶的二核苷酸缝隙所覆盖。就这样,酶就被固定在柱上,而缺乏这种构象特征的蛋白质则流走。随后酶的释放可以用盐梯度或适当高浓度的 $NADH$ 溶液来完成。

用这种亲和层析法可以非常快地获得高度纯化的 LDH,整个计划的进程可以用各部分的酶活性测定来监测,再测定各组分的

蛋白质含量就可以知道产物的比活力。最后酶纯度(均一性)可用凝胶电泳法检查,也可用免疫扩散或 ELISA 法检查。该产物可用于后续的实验。

二、试剂

1. 亲和层析用

20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.6)

活性蓝-琼脂糖

20 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 1mmol/L β -巯基乙醇

20 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 1mmol/L β -巯基乙醇和 1mmol/L 苯甲基磺酰氟

20 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 0.5mmol/L β -巯基乙醇和 1mmol/L 乳酸锂

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 0.5mmol/L β -巯基乙醇

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 0.5mmol/L β -巯基乙醇和 1mmol/L NADH

2. LDH 活性测定用

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 99mmol/L 乳酸锂

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 0.7mmol/L NAD^+

500 mmol/L NaCl, 内含 18mmol/L NaHCO_3

三、操作方法

1. 鸡胸肌抽提物的制备

取鸡胸脯去皮,剪碎于低温下研磨两次,用 1.5 倍体积的预冷液 20mmol/L Tris-HCl, pH8.6, 内含 1mmol/L 巯基乙醇和 1mmol/L PMSF 悬浮该肉糜,于 4℃ 搅拌 1 小时进行抽提。然后用双层干酪布过滤,将滤液于 $10000 \times g$ 离心 45 分钟,倒出的上清液再重复离心一遍,最后的上清液可用于下面的实验。

2. 亲和层析柱的准备

所有用于层析的缓冲液都进行抽气。

取一支 10 或 12ml 的塑料注射器,弃去内部柱塞,出口端安上一个塑料活栓,向注射器圆筒下端插入一个合适的软木塞。另用打孔器制作一张具孔的聚乙烯纸(孔径为 $70\mu\text{m}$, 1.5mm 厚)圆片,将其小心地放入注射器底部,也可以代替软木塞。

将注射器竖直放好,内部用约 5ml 的 Tris-HCl 缓冲液 (20mmol/L, pH8.6) 润湿,仔细检查各部位,均无气泡出现方可使用(否则排除气泡),然后打开下端的活栓开关使液体滴出到液面刚好到达软木塞或纸片的上端为止。

取 4ml 溶于 Tris 缓冲液的活性蓝-琼脂糖贮存悬浮液加入到柱内,使其沉降,最后在于胶表面加入适量的溶液。再检查一遍,确认在软木塞上下,圆纸片下或凝胶内部没有气泡出现。若没有气泡,可用 10ml 的 20mmol/L Tris-HCl (pH8.6), 内含 1mmol/L 巯基乙醇的缓冲液平衡,流速控制在大约 1ml/分钟,注意勿使液体平面低于胶床的上表面。

3. 层析柱的加样和洗脱

取 6~7ml 鸡胸肌抽提物作为一份样品,小心将 5ml 加到柱的上端,此过程不能破坏胶床上表面(可以用一个合适的滤纸片置于胶床上表面,减少破坏表面的危险性)。收集一个 5ml 组分,作上“流出液”标记,放置一边。

(1)第一次洗脱:用 $5\times 5\text{ml}$ Tris-HCl 缓冲液(内含 1mmol/L 巯基乙醇, 1mmol/L PMSF)洗脱该柱,分别收集各组分,作上“洗脱 1, 管 1”, “洗脱 1, 管 2”等标记,放置一边。

(2)第二次洗脱:用 $1\times 5\text{ml}$ 的 1mmol/L 乳酸锂和 1mmol/L NAD^+ 的混合液(溶于含 0.5mmol/L 巯基乙醇的 Tris-HCl 缓冲液中)进行进一步洗脱,此步洗脱弱结合的脱氢酶类,收集组分,标上“乳酸锂洗脱液”,放置一边。

(3)第三次洗脱:接着用 $2\times 5\text{ml}$ 含 0.5mmol/L 巯基乙醇的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.6) 洗脱,收集组分,标上“洗脱

2,管 1”,和“洗脱 2,管 2”,置一边。

(4)第四次洗脱:最后用 $1 \times 5\text{ml}$ Tris-HCl 缓冲液(10mmol/L , pH8.6, 含 0.5mmol/L 巯基乙醇和 1mmol/L NADH)洗脱 LDH, 用 $2 \times 5\text{ml}$ 含巯基乙醇的 Tris-HCl 回收另外的酶。最后这三个组分应含有较高的 LDH 活力。

4. 蛋白质浓度的测定

(1)含有蛋白质和核苷酸的溶液测定法:这类溶液的蛋白质浓度不能简单地用 280nm 光吸收测定,要用 A_{280}/A_{260} 比值来作近似计算。此法可用于含 NAD^+ 和 NADH 的洗脱组分的测定。

将各洗脱组分分别于 280nm 下测其 A_{280} ,并作记录,注意各组分的空白对照要用对应的洗脱缓冲液。然后改换波长,于 260nm 下读出各组分的 A_{260} ,利用下式进行粗略计算:

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/ml}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

(2)对于不含核苷酸的蛋白质溶液的测定:根据经验下列两个消光值有助于测定

$$\epsilon_{280}^{1\%}(\text{均一匀浆}) = 10.0$$

$$\epsilon_{280}^{1\%}(\text{兔肌 LDH}) = 14.9$$

前一个可用于粗抽提液和第一洗脱组分的测定,后一个值可用于 LDH 组分的测定。

(3)用 Lowry 法或 Bradford 法测定:若时间允许,用这两种方法的任何一种均能更精确地测定出蛋白质浓度,详细的操作步骤可以参看本书有关实验。

5. 乳酸脱氢酶活力测定

待分析的样品共有 11 个组分。准备 13 支试管并编号,各管内加入 1.4ml 乳酸锂, 0.70ml NAD^+ , 0.4ml NaCl 溶液,混匀。向 1, 2 号管加入 $10\mu\text{l}$ 缓冲液,于 340nm 调整零点。

接着用一次性移液枪头吸取待分析组分 $10\mu\text{l}$,一次一个样品逐个进行,混匀,测 A_{340} (尽量在加入酶液后的 1 分钟进行读值)。若吸光值太高,可将组分溶液稀释后再测,记录结果。

四、比活力计算

活力采用国际单位表示,即 μmol 产物/min/mg 蛋白质。计算比活力时要用蛋白质含量,摩尔消光系数和测活时间。

五、实验结果

填出下表。

LDH 纯化数据

组分	A ₂₈₀	蛋白质(mg/ml)	活力 ($\mu\text{mol/min}$)	比活力 ($\mu\text{mol/min/mg}$)	产率 (%)
组织总粗提液					
柱流出液					
第一次洗脱					
1					
2					
3					
4					
5					
第二次洗脱(乳酸洗脱液)					
第三次洗脱					
1					
2					
第四次洗脱					
1					
2					
3					

实验三十七 乳酸脱氢酶的垂直板型凝胶电泳

一、原理

垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳是当今使用得最为广泛的生化方法之一,其原理与盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳一样。

本实验是利用此法分析鉴定前一个实验中所分离到的 LDH 样品,电泳条件一个是使 LDH 变性进行电泳,另一个则不然。染色方法有考马斯亮蓝法和 LDH 活性染色法两种,通过这两种染色结果,可以看到蛋白带和具活力酶的位置,确定 LDH 的位置和数目。

二、试剂

用于非变性胶的缓冲液 1.5mol/L Tris-HCl, pH8.5

用于变性胶的缓冲液 1.5mol/L Tris-HCl, pH8.5, 0.4% (W/V) SDS

24% (W/V) 丙烯酰胺 (Arc), 用蒸馏水溶解, 内含 1% (W/V) 甲叉双丙烯酰胺 (Bis)

10% (W/V) 过硫酸铵

TEMED

电极缓冲液 I (10×中性胶缓冲液): 0.5mol/L Tris-HCl + 0.02 mol/L 甘氨酸, 调 pH8.3, 用前稀释。

电极缓冲液 II (5×SDS 胶缓冲液): 用 500ml 电极缓冲液 I

与 50ml 的 10%(W/V)SDS 混合,使终体积为 1 升。用前稀释。

非变性样品溶解缓冲液:用 0.2mol/L Tris-HCl(pH8.3)配制 0.005%溴酚蓝。此液与蛋白样品按 1:1 混合即可用。

变性样品溶解缓冲液:2.5%SDS,5% β -巯基乙醇,10%甘油和 0.005%溴酚蓝用 0.2mol/L Tris-HCl(pH8.3)作溶剂。此液与蛋白样品按 1:1 混合后在沸水浴上加热 2 分钟。

考马斯亮蓝染色液:450ml 甲醇与 90ml 乙酸混合,加 2.5g 考马斯亮蓝 R,搅拌,释至 1 升。过滤后可用。

脱色液:50ml 甲醇与 75ml 乙酸混合,加水至 1 升即成。

LDH 制备液,来自乳酸脱氢酶的亲和层析分离实验,用 0.2mol/L Tris-HCl(pH8.5)调整总蛋白质浓度在 1~2mg/ml 范围。

标准蛋白质参照物:

	分子量	pI
磷酸化酶 B	97400	5.9~6.0
小牛血清白蛋白	66200	4.5~4.6
碳酸酐酶	31000	6.0~6.5
鸡蛋清溶菌酶	17200	10.9~11.0

LDH 活性染色试剂

①溶液 A:将 0.15mol/L 乳酸锂,1mmol/L NAD^+ ,15mmol/L NaCl 和 8.5mmol/L MgCl_2 用 80mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.4)溶解配制。

②溶液 B:氮蓝四唑(MW=817.7),5mmol/L,用 80mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.4)配制。

③溶液 C:吩嗪二甲酯硫酸盐(MW=306.3),1mmol/L,用 80mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.4)配成。

注意,溶液 B 和 C 对光敏感。应暗处 4℃保存,用前临时配制,混合活性染色在染色过程当中也需避光进行。

三、操作方法

1. 凝胶的制备

将凝胶模洗干净,干燥后组装好待用。

凝胶液按如下配方准备:4.5ml 缓冲液(用于非变性胶或变性胶制备的缓冲液),6.0ml Arc/Bis,7.6ml 水,混匀抽气,加 22.5 μ l 过硫酸铵和 22.5 μ l TEMED,轻轻搅匀,此即 8%的凝胶工作液。将该液倒入两块玻板间的空间内,使其高度离上端几毫米处即可,检查确定没有气泡存在方可插入“梳子”,若有气泡可用细丝将其赶出。“梳子”深度约 1.5cm。40 分钟左右凝胶即可形成,然后小心取出“梳子”,“梳子”齿的多寡决定将来点样孔的多少。再将周边的夹子取下,用水洗净“梳子”孔和下边的凝胶。最后按操作程序小心将其装入到电泳槽上,拧紧螺栓,加电极缓冲液至合适高度。

2. 加样

用天然样品缓冲液和变性样品缓冲液分别将 LDH 样品按 1:1 稀释,根据点样孔的多少决定稀释样品量。

用微量注射器或移液枪将样品加到凝胶顶部的样品槽中,注意要使枪头或针头在电极缓冲液面之下,蓝色样品会自动沉降到槽底。在不同的孔中分别点 5,10,20 μ l 样品。标准蛋白混合物点在胶中间的一个样品槽中。

3. 电泳和染色

接通电源,注意电极勿接错,控制在 20mA,70~100V。等染料接近凝胶底部 2cm 左右时电泳完毕,拆开电泳装置,将凝胶膜平放好,在两玻璃板之间插入一薄金属板将两玻板小心分开,取下一块玻璃板,凝胶则在另一玻璃板上,用合适的东西在凝胶的一角作好记号,以确保蛋白质泳动的槽带顺序不会出错。

用一薄铲将凝胶小心地从玻璃板上取下,将凝胶转移入一大平皿中(或瓷盘中),用考马斯亮蓝染色液浸泡染色半小时左右,但不能超过一小时,再用 CH₃OH/hoac 混合液脱色,最好在脱色过程中置于慢速摇床上进行。

若是用非变性胶分离样品,染色处理略有不同,首先是将胶用小刀片从胶上切出两个泳动槽带用于考马斯亮蓝染色,剩余部分用于活性染色。

4. LDH 活性染色

将非变性胶置于一张铝箔上(铝箔可预先叠成小船形),或合适的器皿中,然后依序加下列溶液:6.5ml 溶液 A,2.5ml 溶液 B,0.25ml 溶液 C,将器皿前后摇动混匀混合液,并浸泡凝胶,然后避光放置(铝箔可折叠覆盖)15~20 分钟,检查凝胶,LDH 则呈蓝色清晰可见。

四、实验结果

1. 计算出已知标准蛋白质在变性胶和非变性胶中相对于染料的迁移率,并画出电泳结果图。

2. 在变性胶中,估计主要蛋白带的分子量,将其与已报导的 LDH 亚基分子量作比较。

3. 在非变性胶中,主要蛋白带的分子量情况又如何?

4. 比较非变性胶中活性显色带和蛋白染色带的位置关系。

5. 从这些数据你能决定哪种 LDH 同功酶占主导地位。

实验三十八 酰化酶 I 的制备与检测

一、原理

酰化酶有 I 和 II 两种,二者具有不同的专一性。在猪肾中含有丰富的酰化酶,经过水抽提,pH5.0 除杂蛋白,硫酸铵盐析,最后经丙酮分级分离可从猪肾中获得较为纯净的酰化酶 I。

酰化酶 I 具有光学异构专一性,它能将 N-乙酰-L-氨基酸水解生成 L-氨基酸和乙酸,但对 N-乙酰-D-氨基酸不能产生任何作用。该酶的最适 pH 在 7.0~7.5 之间,用磷酸盐缓冲液来维持 pH 环境。

酰化酶 I 是解决 D,L-氨基酸消旋混合物的有用工具,在实际工作中有一定的应用价值。

二、试剂

2 mol/L HCl、2 mol/L NaOH、硫酸铵、丙酮、5%乙酸钡溶液、6%乙酸、粗食盐、1%茚三酮溶液、5%三氯乙酸;

0.08mol/L N-乙酰-DL-蛋氨酸溶液:取 1.5296g N-乙酰-DL-蛋氨酸,加水溶解,用 2mol/L NaOH 调至 pH7.0,定容到 100ml;

0.1mol/L 磷酸盐缓冲液:取 61ml、0.1mol/L Na_2HPO_3 液和 39ml 0.1mol/L NaH_2PO_3 液混匀即可。

三、操作方法

1. 酰化酶 I 的制备

(1)初步提取和分离:取新鲜猪肾,去除脂肪和结缔组织后剪成碎块,称取 120 克,在低温下用组织捣碎器绞碎 2~3 次,加 2 倍体积冰水,不断搅拌提取半小时,然后以 3000r/min 离心 20 分钟,除细胞碎屑等,取上清并量出体积,留出 2ml 左右经透析后测定蛋白质含量及酶活力。

将上述离心液置冰浴中冷却到 0℃,在搅拌下小心逐滴加入 2mol/L 盐酸,调至 pH4.7~5.0。所得稠厚悬浮液立即在冰冻离心机上以 4000r/min 离心 20 分钟,所得红色的上清液立即用 2mol/L NaOH 调至 pH6.5,量出体积并留适量样品,经透析后测定蛋白质含量及酶活力。

(2)硫酸铵盐析:将(1)步所得溶液按 266 克/升,慢慢加入硫酸铵粉末,边加边搅拌,控制 pH 在 6.0~6.2(若太低可用 2mol/L NaOH 调节),在冰箱中放置过夜,次日将上清液小心弃去(可用于制备酰化酶 II),下层用离心机离心,2500r/min 约 20 分钟,留沉淀,将该沉淀用 4ml 水悬浮,装入透析袋内透析,直到无硫酸铵为止。透析后的溶液离心去除变性蛋白,得到颜色较深的离心液,量出体积并留适量样液用于测定蛋白质和酶活力,此为粗酰化酶 I 制剂。

(3)丙酮分级分离:将(2)步所得的溶液用水作适当稀释,并控制 pH5.9~6.0,使之冷却。向其中加入 0.4 倍体积的预冷(-15℃)丙酮,边滴加边搅拌,使用盐水浴控温-10~-15℃。然后迅速在冷冻离心机上离心(-8℃)除去沉淀,得浅黄色溶液。将此溶液仍置冰-盐浴中冷却,再加入 0.6 倍体积的-15℃丙酮(按原来水溶液的体积计算)。在-8℃冷冻离心,弃去上清液,沉淀迅速用 4ml 冰水溶解,然后用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)透析 2 小时左右,离心除不溶物,所得溶液为浅红色,量其体积并留出适量样液以测定蛋白质和酶活力,其余溶液迅速冰冻保存或冰冻干燥。

2. 酰化酶 I 的活力测定

(1)根据酰化酶 I 的催化特性,测定产物 L-氨基酸的产生量来计算酶的活力,测定方法如下:可用茚三酮显色法或甲醛滴定法定量测定氨基酸含量。

●方法一:取一支 5ml 试管,加 0.4ml 0.08mol/L N-乙酰-DL-蛋氨酸中性溶液和 0.4ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0),于 37℃ 保持 5 分钟,然后加入 0.2ml 已稀释好的酶液(约 1mg/ml),迅速混匀,记时,在不同时间(第 2,4,6,8,10 分钟)分别取出 0.05ml 或 0.1ml 反应液,立即加入预先已加好 0.05ml 5%三氯乙酸溶液的试管中,混匀以停止酶反应。然后用茚三酮溶液显色法测定所释放出来的 α -蛋氨酸量。

将酶液于沸水浴中加热 5 分钟,取 0.2ml 热变性酶液代替正常的酶液作空白对照,其余操作同上。

●方法二:取一支 10ml 试管,加入 1.2ml 0.08mol/L N-乙酰-DL-蛋氨酸中性溶液和 1.0ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0),于 37℃ 保持 5 分钟,然后加入 0.8ml 酶液,迅速混匀,记时,在不同时间(第 2,4,6,8,10 分钟)分别取出 0.5ml 反应液,迅速加到已预先加好 0.05ml 5%三氯乙酸的试管中,立即混匀以终止酶反应。然后用甲醛滴定法测定释放出来的 α -蛋氨酸量。同时以热变性酶液代替正常的酶溶液作为空白对照,其余操作步骤同上。

(2)蛋白质含量测定:可选用双缩脲法或 Folin-酚法进行。

四、结果处理

酶促反应的初速度可以茚三酮溶液显色法测得的光密度或甲醛滴定法所消耗碱的毫升数为纵坐标,时间为横坐标所得的速度曲线求得。

酶的比活力以每小时每毫克蛋白氮所水解底物的微克分子数表示($\mu\text{mol}/\text{mgN}/\text{h}$)。

总活力为比活力乘以总蛋白氮量,以每小时水解底物的摩尔数来表示(mol/h)。

将实验结果填入下表：

测定项目 实验步骤		总体积 (ml)	总蛋白质 (mg)	总蛋白氮 (mg)	比活力 ($\mu\text{mol}/\text{mgN}/\text{h}$)	总活力 (mol/h)	回收率 %
①	粗提取液						
	调 pH 除杂蛋白						
②硫酸铵盐析							
③丙酮分级分离							

五、实验说明

1. 酶液的稀释：待测活力的酶原液在测定前要用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)作适当稀释，据经验可参考下列表格数据：

方法一，稀释倍数(V/V) 方法二，稀释倍数(V/V)

粗提取液	1 : 50~100	1 : 25~50
调 pH 除杂蛋白	1 : 50~100	1 : 25~50
硫酸铵盐析	1 : 100~200	1 : 100~150
丙酮分级分离	1 : 200~500	1 : 200~250

2. 测蛋白质含量时选用的溶液体积，下列数据可供参考：

步骤(1)a： 0.1~0.2ml

步骤(1)b： 0.3~0.5ml

步骤(2)： 0.2~0.3ml

步骤(3)： 0.2~0.5ml

附一 茚三酮溶液显色法

1. 试剂

0.3mmol/L 标准甲硫氨酸溶液；

0.2mol/L 柠檬酸缓冲液(pH5.0)：21.008 克柠檬酸(含 1 分子结晶水)溶于 200ml 水，再加入 200ml 1mol/L NaOH 溶液，定

容至 500ml;

0.01mol/L 氰化钾溶液:取 0.1628g 氰化钾溶于水,定容到 250ml;

60%乙醇。

氰化钾-乙二醇甲醚-茛三酮溶液:1.25g 茛三酮溶于 250ml 乙二醇甲醚使成为 5%(W/V)溶液,将 2.5ml 的 0.01mol/L 氰化钾溶液用乙二醇甲醚稀释至 125ml,充分混合,然后把 125ml 氰化钾-乙二醇甲醚溶液与 25ml 茛三酮-乙二醇甲醚溶液相混合,置棕色瓶中待用,正常应为浅黄色微带青色。

2. 操作

将 1ml 含有 0.05~0.3 μ mol 的氨基酸溶液与 1ml 0.2mol/L 柠檬酸缓冲液(pH5.0)充分混合,然后加入 1ml 氰化钾-乙二醇甲醚-茛三酮溶液,充分混匀后,在 100℃水浴中加热 15 分钟,以自来水冷却,放置 5~10 分钟,以 3ml 60%乙醇稀释,充分摇匀,于 570nm 处比色。以 1ml 水代替氨基酸溶液作为空白对照,其余操作同上。画出标准曲线。

3. 注意事项

(1)氰化钾为剧毒物质,必须谨慎按章操作。

(2)茛三酮需重结晶。

(3)乙二醇甲醚的处理:因市售的乙二醇甲醚长期放置后有少量过氧化物需进行处理。取 5 克硫酸亚铁加入 500 克乙二醇甲醚中,振摇 1~2 小时,过滤除去硫酸亚铁,再于蒸馏瓶内蒸馏,收集沸点为 121~125℃馏分,此时应为透明无色液体。

(4)本测定必须在无氨环境中进行,一切试剂必须密闭,以免被空气中的氨气所沾污。

(5)茛三酮与氨基酸所生物的颜色在一小时内稳定,故加乙醇稀释后,应立即比色。

(6)氰化钾-乙二醇甲醚-茛三酮溶液配制后必须隔夜才能应用。配制后在一星期内稳定。

附二 微量甲醛滴定法

1. 试剂

中性甲醛溶液:将试剂级甲醛(36%~37%)调到 pH7(用 pH 计检查)。或是在 50ml 的 36%~37% 甲醛中加入 1ml 0.1% 酚酞乙醇水溶液,然后用 0.2mol/L 氢氧化钠溶液滴定到微红色。该试剂临用前配制。

酚酞指示剂:0.1% 酚酞的 50% 乙醇溶液

0.01mol/L 氢氧化钠标准溶液,使用前标定;

0.01mol/L 甲硫氨酸溶液。

2. 操作方法

向取出的反应液中加入 3 滴 0.1% 酚酞指示剂,然后用 0.01mol/L 标准 NaOH 溶液滴定到微红色,几秒钟内不变色,再加入 1ml 中性甲醛溶液,混合后用标准氢氧化钠滴定到终点。记下所消耗的碱量(加入甲醛后所消耗的碱量代表所滴定的氨基酸数量)。每次活力测定所取的各个样品最好一起滴定,力求滴定终点一致。

用甲醛滴定法正式测定样品之前,在锥形瓶中预先加入 0.05ml 5% 三氯乙酸溶液,然后再加入 0.5ml 0.01mol/L 甲硫氨酸溶液作为滴定练习,并求出回收率。

实验三十九 Procion Red HE-3B 柱分离 纯化胆绿素还原酶

一、原理

三嗪染料是一类活性染料,它与许多蛋白质,特别是氧化还原酶能产生特异性的吸附,而且由此类染料为配基制作的亲和层析柱具有良好的通用性与化学稳定性,因此,此类亲和层析柱在生物高分子分离中的应用愈来愈广泛,Procion Red HE-3B 是一种单氯三嗪染料,用它作配体制备的染料层析柱可分离多种蛋白质。

胆绿素还原酶是催化血红素降解的关键酶之一,在 NAD(P)H 存在下,它能将胆绿素转变为胆红素,本实验用 Procion Red HE-3B-Sepharose 4B 柱从猪肾中分离纯化胆绿素还原酶。

二、试剂

新鲜猪肾(4℃)胆绿素溶液(2.0mmol/L)、NADPH 溶液(10mmol/L)

Buffer A: 配制 1.36gKH₂PO₄+0.33gNaOH+85.6g,定容至 1000ml。

三、实验方法

1. 粗酶的提取

取新鲜猪肾若干克,去除脂肪与结缔组织后,用 0.9%NaCl 溶液漂洗数次去掉血色,然后加入 BufferA [1:2(W/V)]匀浆。

匀浆液以 $15000\times g$ 离心 15 分钟,取上清液,上清液于 $66000\times g$ 超速离心 60 分钟,取上清液,40%~65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,盐析后沉淀用 BufferA 溶解,用蒸馏水透析至无 SO_4^{2-} 。然后,将透析液 $15000\times g$ 离心 10 分钟,取上清,冷冻保存。

2. DEAE₅₂-纤维素柱层析

按常规方法处理 DEAE-纤维素,装柱 ($1.5\times 25\text{cm}$),用 BufferA 平衡,取一定量粗酶液上柱,BufferA 淋洗,当收集液 $\text{OD}_{280} < 0.02$ 时,换用 0~0.3mol/L KCl 的 BufferA 梯度洗脱 ($2\times 150\text{ml}$, 3ml/20ml/管),抽出若干管测活力,同时绘出蛋白质的洗脱曲线,合并有酶活性部分,浓缩,冷冻保存。

3. Sephadex G-100 柱层析

按常规方法处理 Sephadex G-100,装柱,将前步层析得到的酶液上柱,用 BufferA 洗脱,流速同前,收集合并有酶活性的部分,浓缩,冷冻保存。

4. Procion Red HE-3B-Sepharose 4B 亲和层析

(1) Procion Red HE-3B-Sepharose 4B 柱的制备:称取湿 Sepharose 4B 40g,抽滤,用蒸馏水淋洗。同时称取 400mg 染料,倒入锥形瓶中,加入 40ml 蒸馏水溶解。将淋洗后的凝胶倒入染料液中,于 45℃ 摇动 30 分钟,然后加入 NaCl 至终浓度为 2%,继续摇动 30 分钟后,加入 Na_2CO_3 至终浓度为 1%,45℃ 下摇动 4~6 小时后,用蒸馏水和 1mol/L KCl 溶液反复淋洗,去除棕色即可。

(2) Procion Red HE-3B-Sepharose 亲和层析

将制好的染料基质装柱 ($1.5\times 25\text{cm}$),BufferA 平衡,加入第二步层析后的酶液,淋洗,然后用含 1.0mol/L KCl 的 BufferA 阶梯式洗脱,流速同前,收集酶活性部分,绘制洗脱曲线。

四、酶活力的测定

反应总体积 4ml,其中含胆绿素 $5.0\mu\text{mol/L}$, NADPH $100\mu\text{mol/L}$,适量的酶,缓冲液为 BufferA,37℃ 黑暗条件下保温

30 分钟,450nm 处测 OD 值。

酶活力单位的定义:于 37℃ 每分钟催化形成 1nmol 胆红素的酶量,即为一个活力单位。

五、蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定采用 Folin-酚法。

六、分子量的测量

将最后一步层析所得酶液用 SDS-PAGE 法测定其分子量。

七、结果与分析

各步纯化过程中蛋白含量与酶活力单位

纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白含 量(mg)	总活力	纯化 倍数	比活 U/mg	收 集 率 %
15000×g						
66000×g						
40%~65%(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析						
DEAE _{s2} 柱层析						
Sephedex G-100 柱层析						
Procion Red HE-3B-						
Sepharose 4B 柱层析						

实验四十 酶活性修饰实验

一、原理

酶分子中的许多侧链基团可以被化学修饰。这种修饰可以帮助了解哪些基团是保持酶活性所必需的,哪些基团对维持酶的催化反应并不重要。当化学修饰试剂与酶分子上的某种侧链基团结合后,酶的活性降低或者丧失,表明这种被修饰的残基是酶活性所必需的。反之亦然。

酶分子中有许多基团可被共价化学修饰,如巯基、羟基、咪唑基、胍基、氨基和羧基等。可以用来进行化学修饰的试剂也很多,如5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸), (DTNB)和 N-乙酰马来酰亚胺 (NEM)是巯基的修饰剂,可以用来鉴定半胱氨酸残基是否是酶活性所必需的。磷酸吡哆醛可以与赖氨酸残基起反应;2,3-丁二酮则可以和精氨酸残基起反应。本实验以胆绿素还原酶为材料,分别以DTNB、NEM、磷酸吡哆醛和丁二酮为化学修饰剂,研究胆绿素还原酶活性所必需的残基。

二、试剂

胆绿素:浓度配制成 2mmol/L;

NADPH:浓度配制成 10mmol/L;

DTNB:浓度配制成 0.25mol/L;

NEM:浓度配制成 0.05mol/L;

磷酸吡哆醛:浓度配制成 20mmol/L;

2,3-丁二酮:浓度配制成 0.115mol/L;

胆绿素还原酶；

0.01mol/L, pH7.4 磷酸盐缓冲液；

三、操作方法

酶的测定：酶的测定是在 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液中完成。总体积 4ml, 内含 5.0 μ mol/L 胆绿素、100 μ mol/L NADPH, 酶量固定。根据修饰实验的需要, 加入不同的修饰试剂。于 37℃ 暗处保温 30 分钟, 450nm 测定吸光值。

(1) 在 DTNB 修饰反应中, 向不同的反应试管中分别加入 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40mmol/L 的 DTNB。

(2) 在 NEM 修饰反应中, 向不同的反应试管中分别加入 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00mmol/L NEM。

(3) 在磷酸吡哆醛修饰反应中, 向不同的反应试管中分别加入 0.00、1.00、2.00、3.00mmol/L 的磷酸吡哆醛。

(4) 在 2,3-丁二酮修饰实验中, 向不同的反应试管中分别加入 0.0、10.0、20.0、30.0mmol/L 的 2,3-丁二酮。

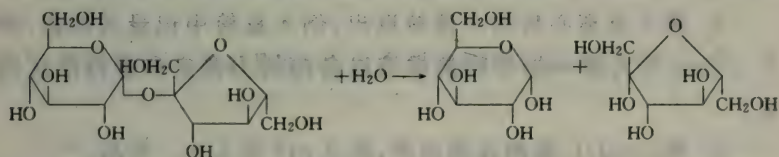
四、结果与分析

1. 以修饰剂浓度为横坐标, 以残存酶活性为纵坐标, 分别绘制出修饰剂浓度变化对酶活性的影响。

2. 分析胆绿素还原酶活性所需的基团。

实验四十一 酵母蔗糖酶的部分 纯化和性质测定

蔗糖酶(E. C. 3. 2. 1. 26)能催化非还原性双糖(蔗糖)的 1,2-糖苷键裂解,释放出等量的果糖和葡萄糖。



从式中可以看到,每摩尔蔗糖水解产生两摩尔还原糖,蔗糖的裂解速率可以通过 Nelson 法测定还原糖的产生数量来测定。其它的还原糖量测定法可见糖类实验一部分。一个酶活力单位规定为在标准分析条件下每分钟催化底物转化的数量。比活力单位为每毫克蛋白含有的酶活力单位。

啤酒酵母中含有丰富的蔗糖酶,本实验以它为原料,通过破碎细胞、热处理、乙醇沉淀柱层析等步骤提取蔗糖酶,并对其性质进行测定。

所有的纯化步骤均在 0~4℃ 之间进行,除非特别说明。

I. 酶的纯化

一、试剂

啤酒酵母、甲苯、95%乙醇、DEAE-纤维素、0.05mol/L Tris-

HCl 缓冲液, pH7.3。

二、操作方法

1. 取 20g 干酵母, 或市售鲜啤酒酵母以 2000rpm 离心 10 分钟后, 所得的 20 克沉淀, 加 5~10g 细砂, 加 20ml 甲苯, 在研钵内磨成糊状。然后每次加 10ml 水, 研磨 10 分钟左右, 共 3 次, 使其呈糊状。

2. 将研磨好的内容物转移到 50ml 离心管中, 平衡后以 12000rpm 离心 15 分钟。

3. 用吸管小心将离心后的中间水层转移到干净的离心管中, 勿带上层甲苯相, 然后以 12000rpm 离心 15 分钟。

4. 将 3 步离心后的上清液取出, 倒入量筒中记录其体积, 留下 1.5ml 作为第一组分粗抽提液以备酶活力测定和蛋白浓度测定。

5. 用 1mol/L 醋酸逐滴加进, 调其 pH 至 5.0。

6. 将上述抽提液迅速放入到 50℃ 的冰浴中, 保温 30 分钟, 在温育过程中经常缓慢摇动试管或搅拌抽提液。

7. 在冰浴中迅速冷却之, 15000rpm 离心 15 分钟, 弃去沉淀。量出上清液体积并记录之, 留下 2ml 做为第二组分(热抽提液)以备酶活力和蛋白质浓度测定。

8. 在第二组分(热抽提液)中加入等体积的 95% 冷乙醇(—20℃, 时间不少于 30 分钟), 保持低温(冰浴)并温和搅拌, 继续搅拌 20 分钟。然后以 15000rpm 离心 20 分钟, 小心弃去上清, 沉淀沥干并用 parafilm 封口, 保存于冰箱中供下面试验用。

9. 将沉淀溶解在 6ml 的 pH7.3, 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液中(第三组分, 酒精抽提液), 搅拌使其完全溶解(5 分钟以上), 以 15000rpm 离心 20 分钟, 弃去沉淀。上清液留下 1.5ml 以备测定酶活力和蛋白质浓度。

10. 装 DEAE-纤维素层析柱(2cm × 20cm), 用 0.05mol/L

Tris-HCl, pH7.3 缓冲液平衡, 约 100ml 流出液即可, 以流出液 pH 与缓冲液 pH 一致为准。然后将第 9 步的酒精抽提液上柱, 上样后用 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.3 缓冲液进行 NaCl 梯度 (NaCl 为 0~100mmol/L) 洗脱, 层析柱联上线性梯度混合器, 混合器中分别装 50ml, 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.3 缓冲液和 50ml 含 100mol/L NaCl 的 0.08mol/L Tris-HCl, pH7.3 缓冲液。洗脱至混合器中液体流完为止, 测定各接收管在 280nm 下的光吸收并测定各管的酶活力, 将最高酶活力的若干管酶液集中, 分装后低温保存, 用于性质测定。留液 (第四组分) 测酶活和蛋白含量。

II. 圆盘电泳测定纯度

原理见前面蛋白质部分, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

一、试剂

胶贮液: 取丙烯酰胺 32g, 甲叉丙烯酰胺 1.0g, 定容到 100ml。

凝胶缓冲液 (pH8.9): 24ml 1mol/L HCl, 18.15g Tris, 0.25ml TEMED, 用蒸馏水定容到 100ml。

0.2% 过硫酸铵。

上极缓冲液: 6.32g Tris, 3.94g Gly, 用蒸馏水定容到 100ml, 使用时稀释 10 倍。

下极电泳缓冲液: 12.1g Tris, 50ml 1mol/L HCl, 定容到 100ml, 使用时稀释 10 倍。

溴酚蓝溶液: 5ml 50% 甘油 + 5ml 上极缓冲液 + 数滴溴酚蓝。

12.5% 三氯乙酸。

0.25% 考马斯亮蓝染色液: 其比例为 90.8ml 50% 甲醇 + 9.2ml 冰乙酸 + 0.25g 考马斯亮蓝。

脱色液: 7.5ml 乙酸 + 5ml 甲醇 + 87.5ml 水。

二、操作方法

1. 制胶:按下表配制各胶成分,配成丙烯酰胺浓度 8%。

成分	样品含量/100ml	pH(25℃)	比例(V/V)
A	32g 丙烯酰胺, 1.0g 亚甲基双丙烯酰胺		1
B	24ml 1mol/L HCl, 18.15g Tris 0.25ml TEMED	8.9±0.2	1
C	0.2g 过硫酸铵		2
上极液	6.32g Tris, 3.94g Gly	8.9±0.2	稀释 10 倍后用
下极液	12.1g Tris, 50ml 1mol/L HCl	8.1±0.2	稀释 10 倍后用

将小玻管下端用乳胶管加短玻棒封好,底部可加几滴 40%甘油,垂直立于支架上,将上述贮液分别抽空气,按比例混合后,立即用注射器注胶,每管高约 8cm,上端用异丙醇封住,静置到清晰界面出现。

2. 安装凝胶管及加入电极缓冲液,上槽液(pH8.9)接负极,下槽液(pH8.1),接正极。

3. 上样:将第 I 步各提纯留液(第一、二、三、四组分)稀释成 1mg/ml 蛋白,取其 50~100 μ l,加 50 μ l 溴酚蓝-甘油溶液,混匀后上样(100~200 μ l)。

4. 电泳:按 2 步中上槽接负极,下槽接正极,2mA/管,通电 30 分钟后加大到 4mA/管,至溴酚蓝指示剂接近凝胶底部为止。

5. 剥胶,固定,染色,脱色:剥胶后在固定液中固定 30 分钟,染色 30 分钟,然后脱色至蛋白区带清晰为止。

6. 观察并记录实验结果,判断酶的纯度。

Ⅲ. 酶活力、蛋白质浓度测定

本实验以 Nelson 方法测定酶活力,其原理是还原糖含有的自

由醛基或酮基在碱性条件下将 Cu^{2+} 还原,而糖本身氧化为糖酸。砷钼酸试剂与氧化亚铜生成蓝色溶液,在 510nm 有最大光吸收,且颜色的深浅正比于还原糖的浓度,从而可以确定酶的活力,测定范围为 25~200 μg 。

蛋白质浓度测定可用 Lowry 法或考马斯亮蓝法完成。

一、试剂

Nelson 试剂:

A 液:无水 Na_2CO_3 25.0g

酒石酸钾钠 25.0g 用 1000ml 定容

NaHCO_3 20.0g

无水硫酸钠 200g

B 液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15.0g 溶于 90ml 水,滴 2 滴浓硫酸,定容到 100ml。

按 A : B = 50 : 2 进行混合即为 Nelson 试剂,用前需 37℃ 以上溶解,防止溶质析出。

砷钼酸试剂:50g 钼酸铵溶于 900ml 水,搅拌加入 42ml 浓 H_2SO_4 ;另取 6.0g 砷酸钠溶于 50ml 水,加入到前一溶液中,彻底摇匀定容到 1 升,37℃ 保温 24 小时,然后贮于室温下的棕色瓶中。

4mmol/L 葡萄糖

4.0mmol/L 蔗糖

0.5mmol/L 蔗糖

0.2mol/L 乙酸缓冲液, pH4.5

4.0mmol/L 果糖

二、操作方法

1. 活力测定的标准曲线

取 10 支试管(具塞),按下表加样(各试剂单位为 ml)。

管号 试剂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4mmol/L Glc	—	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	—	—
4mmol/L Suc	—	—	—	—	—	—	—	—	0.20	—
4mmol/L Fru	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.20
H ₂ O	1.0	0.98	0.95	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	0.80	0.80
A ₅₁₀										

向各管加 1ml Nelson 试剂, 盖上塞子, 置沸水浴加热 20 分钟。

冷至室温, 再向各管加入 1ml 砷酸钠试剂, 混匀放置 5 分钟。

向每支试管加 7ml 蒸馏水, 摇匀。

以 1 号为空白, 于 510nm 下测 A₅₁₀。

以还原糖(μmol)为横坐标, A₅₁₀为纵坐标绘制标准曲线。

2. 各步酶活力的测定

按下表加样, 其中每步骤中的样液按表中倍数作适当稀释(各试剂单位为 ml):

样品	空白	I (1 : 500 稀释)				II (1 : 500 稀释)				III (1 : 1000 稀释)				IV (1 : 400 稀释)			
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
乙酸缓冲液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	0.6	0.55	0.40	0.10	0.55	0.40	0.10	0.55	0.40	0.10	0.55	0.40	0.10	0.55	0.40	0.10	0.10
0.5mol/L 蔗糖	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酶液	—	0.05	0.20	0.50	0.05	0.20	0.50	0.05	0.20	0.50	0.05	0.20	0.50	0.05	0.20	0.50	0.50
A ₅₁₀	室温下准确放置 10 分钟, 各加 1ml Nelson 试剂, 沸水浴 20 分钟, 冷至室温, 各加 1ml 砷钼酸试剂, 5 分钟后, 加 7ml 水																

从标准曲线上查出对应的还原糖量,最后计算出 μmol 还原糖/分钟。

3. 蛋白质含量的测定

标准曲线的制作按前面实验介绍的方法进行,标准蛋白为 2mg/ml BSA。

待测样品 I, II 和 III 的稀释倍数为 $1:4$,用量为 $0.05, 0.20$ 和 0.50ml ,其余同标准曲线。而 IV 不稀释,用 0.25 和 0.5ml 。

若采用考马斯亮蓝法,将上述体积减小到 $1/10$ 。

计算出各部分的蛋白质含量。

4. 结果将上述结果填入下表:

组分	体积(ml)	蛋白(mg/ml)	总蛋白(mg)	活力(U/ml)	总活力(U)
I					
II					
III					
IV					
比活力(U/mg)		提纯倍数		回收率(%)	
I					100
II					
III					
IV					

活力单位定义(U):室温下, $\text{pH}4.5$,每分钟水解产生 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需的酶量。

IV. 酶促动力学

酶促动力学研究酶促反应的速度及影响速度的各种因素,而米氏常数 K_m 值等于酶促反应速度为最大速度的一半时所对应的底物浓度,其数值大小与酶的浓度无关,是酶促反应的特征常数。不同酶的 K_m 值不同,同一种酶在与不同的底物反应时,其 K_m 值也不同。 K_m 值反映了酶和底物亲和能力的强弱程度, K_m 越大表明

酶与底物的亲和力越弱; K_m 值越小,表明酶与底物的亲和力越强。

酶的活力就是酶所催化的反应速度,通常用单位时间内底物的减少或产物的增加来表示。酶反应过程中产物的生成和时间关系可以用进程曲线来说明,曲线的斜率就是酶反应过程中的反应速度。从进程曲线来看,在一定时间内反应速度维持恒定,但随着时间的延长,反应速度逐渐降低,这是由多种因素造成的。所以为了准确表示酶的反应速度必须采用初速度即维持恒定时的速度。同样,不同酶浓度下的反应进程曲线也可以说明这个问题。

酶活力可以被某些物质改变(激活或抑制),凡能降低酶的活性甚至能使酶失活的物质,均称为抑制剂,其中又有可逆抑制和不可逆抑制类型。而可逆的抑制又包括有竞争性抑制、非竞争性抑制等类型。在有抑制剂存在的条件下,酶的一些动力学性质会发生改变,如 K_m , V_{max} 等。而酶的 K_m 、 V_{max} 可通过作图法求得,其方法很多,最常用的就是 Lineweaver-Burk 作图法(即双倒数作图法)。

一、试剂

0.2mol/L 乙酸缓冲液、0.5mol/L 蔗糖溶液、8mol/L 脲。

二、操作方法

1. K_m 值的测定

(1) 时间作用曲线

取试管编号,按下列顺序加入各种试剂,待测酶样用 IV,其稀释倍数按酶活力测定时的数据为准。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
乙酸缓冲液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
0.5mol/L 蔗糖	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
H ₂ O	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	1.0

酶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—
保温时间(分钟)	0	1	2	4	8	10	12	15	20	~			
Nelson 试剂	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
置沸水浴 20 分钟													
磷酸钠	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
保温 5 分钟后加入 7ml 水, 比色													

A_{510}

注:表中试剂加样单位为 ml。

以还原糖的 μmol 数为纵坐标,时间为横坐标作时间作用曲线。

(2)底物浓度的影响

取试管编号,并按下表加样。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
乙酸缓冲液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
0.5mol/L 蔗糖	—	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.2	0.4	0.2	0.4	—
H ₂ O	0.6	0.58	0.56	0.54	0.52	0.50	0.4	0.2	0.4	0.2	1.0
Nelson 试剂	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0	—
酶液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
室温下放置 10 分钟											
Nelson 试剂	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—	1.0
沸水浴 20 分钟后,冷却,加 1ml 磷酸钠溶液于各管中,5 分钟后加 7mlH ₂ O 比色											

A_{510}

注:表中试剂加样单位为 ml。

计算各试管中的[S](蔗糖浓度)和 $v(\mu\text{mol 还原糖}/\text{min})$,用反应速率对底物浓度作图,用 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图。计算出 K_m 和 V_{\max} 。

(3) 脲对蔗糖酶的抑制

取试管编号,按下表加入各种试剂。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
乙酸缓冲液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
0.5mol/L 蔗糖	—	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.4	0.2	0.4	—
8mol/L 脲	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
H ₂ O	0.45	0.43	0.41	0.39	0.37	0.35	0.25	0.05	0.25	0.05	0.85
Nelson 试剂	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0	—
酶液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
从加入酶液开始,反应 10 分钟											
Nelson 试剂	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—	1.0
沸水浴中保持 20 分钟,加入 1ml 砷钼酸试剂,5 分钟后加入 7ml 水,比色											
A ₅₁₀											

注:表中各试剂加样单位为 ml。

以催化速率对底物浓度作用,再用 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图,计算出表观 K_m , V_{\max} , K_i ,说明其抑制类型。

V. pH 对酶活性的影响

pH 对酶反应的速度有显著影响,每一种酶都有一个特定的 pH 值,在此 pH 值下酶反应速度最快,而在此两侧酶反应速度都比较缓慢。因为酶是两性电解质,其上具有许多可解离基团,在不

同的酸碱环境中这些基团的解离状态不同,所带电荷不同,而它们的解离状态对保持酶的结构,底物与酶的结合能力以及催化能力都有重要作用。同时许多底物或辅酶也具解离特性,pH 的变化也影响它们的解离状态,同样也影响酶活力。因此溶液的 pH 对酶活性影响很大。表现酶最大活性的 pH 值即为该酶的最适 pH。不同的酶其最适 pH 不同,一般在中性、弱酸性或弱碱性范围内,如植物和微生物所含的酶,其最适 pH 多在 4.5~6.5;动物体内酶的最适 pH 多在 6.5~8.0。同一种酶因来源不同其最适 pH 也可能不同。

蔗糖酶有两个影响水解蔗糖能力的解离基团,一个 pK_a 约为 7,另一个 pK_a 约为 3,因为底物和产物均为非极性物质,无解离基团,因此实验测出的 pH 影响活力图可反映出蛋白的解离对酶活力的影响,本实验中在不同的 pH 缓冲液中测定酶活力,可得出此条件下的最适 pH。

pH 与酶活性关系的测定是在其它条件(如底物浓度、酶浓度和反应温度等)恒定的最适情况下,于一系列变化的 pH 环境中进行初速度测定。其图形一般为钟形曲线。实验中应注意缓冲液成分不应対分析有干扰。

一、试剂

0.2mol/L 丁二酸缓冲液三种(pH2.5、3.0、3.5):用 50ml 水溶解 5.4g 丁二酸钠($MW=270.0$),用 4mol/L HCl 调 pH 至 2.5 或 3.0 或 3.5,再定容到 100ml。

0.2mol/L 乙酸缓冲液:用少量水将无水乙酸钠溶解,再加酸后用水定容到 100ml,见下表:

0.2mol/L 磷酸钾缓冲液(pH6.0、6.5、7.0):2.72g KH_2PO_4 溶于 50ml 水,用 1mol/L KOH 调 pH 至 6.0 或 6.5 或 7.0,最后定容到 100ml。

pH	无水乙酸钠(g)	1mol/L 乙酸(ml)
3.5	0.078	19.1
4.0	0.223	17.3
4.5	0.549	13.3
5.0	1.00	7.8
5.5	1.37	3.3
6.0	1.54	1.2

其它试剂同前。

二、操作方法

准备试管,编号,按下表顺序加入各试剂。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
反应时的 pH	2.5	3.0	3.5	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.0	6.5	7.0
所用缓冲液	丁二酸系统			乙酸缓冲液系统						磷酸盐系统		
所用缓冲液 体积(ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	均为 0.4ml											
酶液(稀释)	均为 0.2ml											
0.5mol/L 蔗糖	均为 0.2ml											

保温 10 分钟,再加 1ml Nelson 试剂,沸水浴加热 20 分钟,冷却加 1ml 砷钼酸试剂,5 分钟后加 7ml 水,比色。

A_{510}

每一种 pH 缓冲液反应系统均需作一对照管,只是用水代替稀释的酶液,其它全部同上表中的操作一样。

三、结果

列出不同 pH 下酶活力数据,以 pH 对活力作图,找出最适 pH。

VI. 酶的最适温度

酶促反应与一般化学反应一样,受温度的影响,反应速度随温度的升高而加快,但因为酶是蛋白质,在温度升高的同时蛋白质的变性速度也在加快,从而又使反应速度减慢,直至使酶完全失活。因此温度对酶促反应速度的影响具有双重性,其表现是两种对抗效应的综合效果。只有在某一温度时,酶促反应速度最大,此时的温度称为酶作用的最适温度。

温度与酶活性的关系测定与 pH-酶活性关系测定方法类似,即把其它条件(如酶浓度、底物浓度和 pH 等)固定在最适状态,然后在一系列的不同温度下进行初速度测定。通过绘制温度-酶初速度坐标图,可以得到温度-酶活性曲线。

需要说明的是,体外实验中酶作用的最适温度不是一个恒定不变的常数,与反应时间有关,因此酶的最适温度只有在一定条件下才有意义。

一、试剂

与酶活力测定中的一样。

二、实验方法

本实验在 $0\sim 80^{\circ}\text{C}$ 之间选择不同温度测定酶活力,以找出酶在此条件下的最适温度。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
反应时 温度(℃)	室温		37		45		50		60		70		80	
空白反应空白反应空白反应空白反应空白反应空白反应空白反应空白反应														
乙酸缓冲液	均为 0.2ml													
H ₂ O(ml)	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4
酶液(稀 释)(ml)	—	0.2	—	0.2	—	0.2	—	0.2	—	0.2	—	0.2	—	0.2
预保温 t(s)	均为 30 秒													
加 0.5mol/L 蔗糖	均为 0.2ml													
反应时间(min)	均为 10 分钟													
加 Nelson 试剂 1ml 终止反应,沸水浴加热 20 分钟,冷至室温, 加 1ml 砷钼酸试剂,5 分钟后加 7ml 水,比色。														
A ₅₁₀														

三、结果

列出不同温度下酶活力的实验测定数据,并画出温度曲线,找出最适温度。

VII. 分子筛层析测酶分子量

其原理在前述实验中已介绍过。

一、试剂

葡聚糖凝胶(Bio-Gel A1.5m);

0.05mol/L Tris, pH7.2;

40mg/ml 葡萄糖,可用一周;

2.0mg/ml 蓝色葡聚糖(Blue Dextran),可保存三个月;

标准蛋白混合液(4mg/ml),用 0.05mol/L Tris 缓冲液配制,

其中标准蛋白有牛血清白蛋白、细胞色素 C、碳酸酐酶、卵清蛋白、过氧化物酶；

待测酶液 (IV) (2mg/ml)。

二、操作方法

将凝胶用水预膨胀几天，再装柱 (1cm×40cm)，柱高约 35 公分，装柱时不能有气泡、分层、断层等现象，否则重装。用 0.05mol/L Tris 缓冲液平衡。

测定外水体积和内水体积。取 0.5ml 的 2mg/ml 蓝色葡聚糖 (MW=2000000) 和 0.5ml 的 40mg/ml 葡萄糖 (MM=180) 溶液混和在一起上柱。蓝色葡聚糖的测定用肉眼可见 (峰波长=610nm)，葡萄糖峰的测定见葡萄糖的有色反应。

将各种标准蛋白配好后上样 0.5ml，酶液 (IV) 上样 0.5ml，分别上样洗脱，洗脱液为 0.05mol/L Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液，流速为 1ml/2min，自动部分收集器收集，2ml/管，于 280nm 测定光密度确定洗脱体积。

三、结果

列出外水体积 V_0 和各种标准蛋白的洗脱体积 V_e ，以 V_0/V_e 对 $\lg MW$ 作图，以酶样的洗脱体积从图上计算出蔗糖酶的分子量。

VIII. 蔗糖酶的 SDS-PAGE

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的原理见有关实验介绍。

一、试剂

胶贮液 A: 32.0g 丙烯酰胺和 1.0g 亚甲基双丙烯酰胺用约 25ml 水溶解，然后定容到 100ml。

胶贮液 B(SDS 缓冲液, pH7.0): 将 7.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 20.0g Na_2HPO_4 (无水)溶于 800ml 水中, 调 pH 至 7.0, 再缓慢加入 2.0g SDS, 将混合液加热助溶。最后定容到 1 升。当用于上、下极电泳槽时应按 1:1 稀释。

胶贮液 C: 0.8g 过硫酸铵(AP)和 0.13ml TEMED 用 100ml 水溶解, 每天新鲜配制。

0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0): 13.7g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 800ml 水, 用 10%NaOH 调 pH 至 7.0, 再定容至 1 升。

5%SDS(勿冷冻)、50%甘油、0.05%溴酚蓝(棕色瓶贮存)。

标准蛋白: 种类有 β -半乳糖苷酶(MW=135000)、酸性磷酸酶(MW=95000)、磷酸果糖激酶(MW=80000)、BSA(MW=68000)、细胞色素 C(MW=12400)、卵白蛋白(MW=43000)。用 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)(即贮液 B)将这些标准蛋白配成 1.0mg/ml, 分装成每管 0.1ml, 冰冻保存。

12.5%TCA 固定液、考马斯亮蓝染色液、脱色液。

二、操作方法

本实验用连续 SDS-聚丙烯酰胺垂直板式电泳测定蔗糖酶的分子量。

胶的配制按下表进行:

贮液	体积比	贮液样品含量/100ml	pH(25℃)
A	1	32g Arc, 1.0g Bis	
B	2	0.78g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2g Na_2HPO_4 , 0.2g SDS	7.0±0.2
C	1	0.8g AP, 0.13ml TEMED	
上极液	稀释 2 倍后用	同 B	7.0±0.2
下极液	稀释 2 倍后用	同 B	7.0±0.2

按比例配好混合后,立即加入到电泳胶槽中,上面加上“梳子”,再加一层水,等聚合完成后将水吸去。

样品处理:

贮液 B	10 μ l	} 沸水浴加热 2~3 分钟,冷却后上到 胶板样品孔中,每孔约 100 μ l
5%SDS(Na 盐)	20 μ l	
β -巯基乙醇	5 μ l	
50%甘油	20 μ l	
0.05%溴酚蓝	20 μ l	
标准蛋白或酶	25 μ l	

样品加完后,装好电极液,按 3mA/孔,电泳 30 分钟后升高到 7mA/孔,直到溴酚蓝走至下端前沿为止。

电泳完毕后,剥胶浸泡于 12.5%TCA 中固定过夜,然后于染色液中染色 3 小时,最后脱色至区带清晰为止。

三、结果

量出各蛋白带的位置,计算各种标准蛋白和酶的迁移率

$\left(\text{相对迁移率} = \frac{\text{样品迁移距离}}{\text{染料迁移距离}} \right)$ 。用各种标准蛋白迁移率对 $\lg MW$

作图,从酶样的相对迁移率求出酶的分子量。

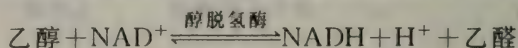
实验四十二 辅酶的测定

许多酶,如不需氧脱氢酶、转移酶,要表现活性,往往需要辅酶的参与。辅酶在催化反应中接受由底物分子上脱下的原子、电子或基团,或供给底物分子以类似物质。酶蛋白和辅酶分别单独存在时,都没有催化活性,当两者按一定的比例关系相互结合成全酶时才具有活性。利用这些特性就可以对辅酶进行测定。选择特定的酶系统,在足够的酶蛋白存在下,辅酶浓度从低到高,测定酶活力与辅酶浓度成直线关系,根据酶表现出来的活力计算出辅酶的含量。

I. 辅酶 I 的测定——醇脱氢酶法

一、原理

辅酶 I, 全称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 缩写为 NAD^+ , NAD , CoI 或 DPN , 其化学式和有关内容见生化教科书的相关章节。辅酶 I 可被乙醇和乙醇脱氢酶定量地还原为 NADH 而测定。



此反应的平衡常数有利于 NADH 向 NAD^+ 的转化, 为使 NAD^+ 被还原, 需调节 pH 值至 9~10, 并采用较高浓度的乙醇。

氧化型辅酶 I 的强吸收峰在 260nm, 而还原型辅酶 I 在 260nm 和 340nm 处各有一吸收峰。因此, 可以通过在 340nm 波长下光吸收的增加来测定辅酶 I 的含量。

二、试剂

醇脱氢酶

0.5mol/L 乙醇-0.1mol/L Tris 溶液, pH10 : 4.6ml 无水乙醇、2.4g Tris 用蒸馏水定容到 200ml。

NAD⁺溶液(1mg/ml):10mg NAD⁺样品定容到 10ml。

三、操作方法

醇脱氢酶的制备:新鲜面包酵母阴处吹干后取 200 克,加 600ml 0.066mol/L Na₂HPO₄,于 37℃下缓慢搅拌 2 小时,室温继续搅拌 3 小时,3000rpm 离心 15 分钟,弃沉淀,上清液迅速加热到 55℃,保持 15 分钟后立即冷却到 0℃,4000rpm 离心 5 分钟,取上清液量出体积,按 100ml 上清缓慢加入 55ml-15℃预冷的丙酮,此过程始终保持在一2℃(盐水浴),然后冷冻离心 4000rpm 10 分钟,弃沉淀,取上清再重复一遍此步骤,沉淀用 50ml 水悬浮,装入透析袋中对冷蒸馏水透析 3~4 小时,离心弃去白色沉淀,上清液用硫酸铵沉淀(每 100ml 加 36g(NH₄)₂SO₄),0℃放置 30 分钟,于 4000rpm 离心 30 分钟,沉淀物用 10ml 蒸馏水溶解,小瓶分装后低温保存备用。

取两支 1cm 光径的比色杯,分别标上空白和样品字样,然后分别加下列试剂:

	空白	样品
乙醇-Tris 液	0.4ml	0.4ml
NAD ⁺ 液	—	0.2ml
蒸馏水	2.5ml	2.3ml
醇脱氢酶液	0.1ml	0.1ml

在紫外分光光度计上先读取加酶液前的 OD₃₄₀,此为 E₀,加酶液后混匀,再读 OD₃₄₀,直到其读数不再上升为止,此为 E₁。

四、结果

$$\begin{aligned}
 \Delta OD_{340} &= (E_1 - E_0)_{\text{样品}} - (E_1 - E_0)_{\text{空白}} \\
 \text{NAD}^+ \% &= \frac{\Delta OD_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \\
 &\quad \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100 \% \\
 &= \frac{\Delta OD_{340} \times \frac{3}{0.2}}{1 \times 6.22 \times 10^3} \times 663.44 \times \frac{1}{1} \times 100 \% \\
 &= \frac{\Delta OD_{340} \times 15}{6.22 \times 10^3} \times 663.44 \times 100 \% \\
 &= \Delta OD_{340} \times 160 \% \\
 &= 1.6 \times \Delta OD_{340}
 \end{aligned}$$

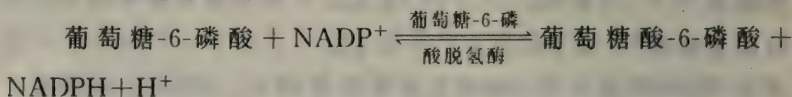
五、说明

由于反应平衡不利于 NAD^+ 的还原, 因此 pH 值和乙醇浓度是正确测定的重要因素, 乙醇浓度不可过高。焦磷酸盐能与抑制醇脱氢酶的重金属离子结合, 因此可用 0.5mol/L 乙醇-0.1mol/L 焦磷酸盐代替 0.5mol/L 乙醇-0.1mol/L Tris 溶液。

II. 辅酶 II 的测定——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法

一、原理

辅酶 II (NADP^+ , NADP , TPN 或 Co II), 全称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。NADP 可通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化还原为 NADPH 而进行测定。



此反应的平衡常数有利于 NADP^+ 的定量还原, 根据 NADPH 在 340nm 波长下光吸收的增加来测定辅酶 II 的含量。

二、试剂

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的制备:新鲜干酵母 400 克,加 1.2 升 0.1mol/L 碳酸氢钠液,40℃搅拌 5 小时,5500rpm 离心 30 分钟,得上清液约 700 毫升。该酶液加 3 倍体积的 0.1mol/L NaHCO_3 ,加入固体硫酸铵至 0.55 饱和度,冷处放置几小时后于 5500rpm 离心 30 分钟,收集上清液,再加入固体硫酸铵至 0.8 饱和度,放置,以 5500rpm 离心 30 分钟,收集沉淀,用水溶解到 400ml。每 114ml 酶液加 85 毫升磷酸钙凝胶(1.6 克干重),0℃搅拌 5 分钟,离心去除上清液。用 216 毫升 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.5)洗涤凝胶,离心,收集上清液,用固体硫酸铵沉淀,收集 0.5 到 0.7 饱和度部分,用少量水溶解后冷冻保存。

0.1mol/L 氯化镁溶液。

葡萄糖-6-磷酸钠溶液(10mg/ml): $\text{G-6-P} \cdot \text{Na}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100mg 溶于 10ml 蒸馏水中。

1 mol/L Tris 缓冲液, pH8.0: 12.12g Tris 溶于 25ml 水,再加 27.5ml 2mol/L HCl,最后定容到 100ml。

NADP^+ 溶液(1mg/ml): 10mg NADP^+ 溶于 10ml 蒸馏水中。

三、操作方法

按下表向 2 个光径为 1cm 的比色杯中添加试剂:

	空白	样品
Tris 缓冲液	0.5ml	0.5ml
MgCl_2 液	0.2ml	0.2ml
葡萄糖-6-磷酸钠液	0.1ml	0.1ml
NADP^+ 液	—	0.2ml
H_2O	2.1ml	1.9ml
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶液	0.1ml	0.1ml

在紫外分光光度计上先读取加酶前的 OD_{340} , 此为 E_0 , 加酶混匀后, 读取 OD_{340} , 直到该值不再上升为止, 此为 E_1 。

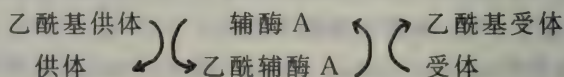
四、结果

$$\begin{aligned}\Delta OD_{340} &= (E_1 - E_0)_{\text{样品}} - (E_1 - E_0)_{\text{空白}} \\ \text{NADP}^+ \% &= \frac{\Delta OD_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \\ &\quad \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100\% \\ &= \frac{\Delta OD_{340} \times \frac{3}{0.2}}{1 \times 6.22 \times 10^3} \times 743.4 \times \frac{1}{1} \times 100\% \\ &= 1.8 \times \Delta OD_{340}\end{aligned}$$

Ⅲ. 辅酶 A 的测定——乙酰化酶-磺胺法

一、原理

辅酶 A 主要是参与酰基化作用,传递酰基,如:它作为乙酰化酶的辅酶反应,



利用这一作用,选用磺胺法进行辅酶 A 的测定。乙酰基的供体和受体分别是乙酸盐和磺胺,在有乙酰化酶和 ATP 足量的条件下,辅酶 A 就能将乙酸根从供体转移到受体上,形成乙酰磺胺,辅酶 A 是决定反应进行程度的关键因素,多余的未被乙酰化的磺胺经重氮化后与萘乙胺形成淡红色溶液,后者在 454nm 处具最大光吸收。测知未乙酰化磺胺的量就可推算出乙酰化磺胺量。

二、试剂

辅酶 A 标准液,用水配成 40 单位/毫升,低温冷冻保存,用时稀释(如 5 单位/毫升)。

混合液:取纯度在 70% 以上的 ATP 钡盐 1.2g 溶于 20ml 0.1mol/L HCl(用冰浴)中,加 0.4g 无水硫酸钠,以除去钡离子,

过滤取滤液,再加入几粒硫酸钠结晶,如无白色沉淀产生则表明钡离子已去尽。向溶液中加入 25ml 0.25mol/L 柠檬酸钠,5.6ml 0.02mol/L 磺胺,6.25ml 1mol/L 醋酸铵,pH7.0~7.4,加蒸馏水至总体积达 126.25 毫升,低温冷冻保存。

1mol/L Tris 液:12.1g Tris 溶于 25ml 水和 11ml 4mol/L HCl 中,用 0.5mol/L NaOH 调 pH 至 8.0~8.4,最后定容至 100ml。

0.2mol/L 半胱氨酸盐溶液:1.5763g 半胱氨酸盐酸盐溶于 50ml 蒸馏水中。新鲜配制。

5%三氯乙酸液;

0.1%亚硝酸钠液,新鲜配制;

0.5%对氨基磺酸氨溶液;

0.1%萘乙胺盐酸盐溶液。

乙酰化酶的制备:取鸽子断头放血,迅速取出肝脏,去脂肪,剪碎置于 -10°C 的丙酮(用固体 CO_2 冷冻)中,用组织捣碎器捣碎 2~3 分钟,再用布氏漏斗抽滤,并用无水新鲜丙酮洗 2~3 次,置真空干燥器中干燥,在研钵中研碎,过 20 目筛,以除结缔组织,产物即鸽肝丙酮粉,置干燥器冷藏保存。

取鸽肝丙酮粉加入 10 倍体积的 0.02mol/L 碳酸氢钾液,匀浆后以 4000rpm 离心 5 分钟,取红色混浊的上层液置于 -20°C 冷冻过夜,次日融化后于 30°C 保温 4 小时,以破坏肝抽提液中的辅酶 A,然后以 20000rpm 离心 10 分钟,得红色澄清液,冷冻备用。

三、操作方法

取试管(10mm \times 100mm)14 支,编号按下表加样

下表各管混匀后离心,取上清液 1ml 加入到预先有 10ml 0.2mol/L HCl 的试管中,各加 1ml 0.1% NaNO_2 ,摇匀后放置 5 分钟,再加入 1ml 0.5%对氨基苯磺酰胺,破坏剩余的亚硝酸盐,以免干扰样品的测定。在比色前各加 1ml 0.1%萘乙胺盐酸盐,摇匀,用 2cm 光径比色杯于 545nm 波长比色测定,读取 OD 值。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	1~4 为空白管				5~10 为标准样					11~14 为待测样				
Tris 缓冲液					均为 0.15ml									
0.2mol/L Cys 液					均为 0.1ml									
CoASH														
样 品 液 (ml)	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4
混合液					均为 0.5ml									
H ₂ O(ml)	0.85	0.85	0.85	0.85	0.65	0.65	0.65	0.45	0.45	0.45	0.65	0.65	0.45	0.45
乙酰化酶液					均为 0.15ml									
	摇匀, 38℃ 保持 1.5 小时													
5%三氯乙酸					均为 4ml									

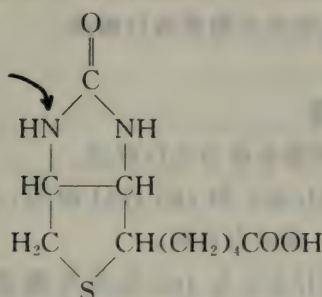
四、结果

将空白及高剂量(2U)和低剂量(1U)的OD值平均后,以空白OD值减去各组OD值,得 ΔOD 值。以标准样品的高、低剂量的 ΔOD 值之和为准($\Delta OD_{SH} + \Delta OD_{SL}$)对比样品中 ΔOD 值之积($\Delta OD_{TH} + \Delta OD_{TL}$)即可得出样品中的相对比值,将其乘上标准样品的单位浓度以及样品的稀释倍数即得样品的单位值。

实验四十三 抗生物素蛋白-生物素复合物:配体结合滴定曲线

一、原理

生物素是羧化反应过程的一种必需因子。例如,丙酮酸羧化成草酰乙酸的反应就是由丙酮酸羧化酶催化完成的,在该酶的一个赖氨酸残基的 ϵ -氨基上共价结合有生物素。生物素转化为 N' -羧化生物素的反应部位如下图所示,箭头所指的氮原子即为二氧化碳结合位点。驱动碳酸盐和生物素转化为 N' -羧化生物素的能量由 ATP 提供。



生物素

抗生物素蛋白是一种分子量约为 $66 \times 10^3 \sim 70 \times 10^3$ 的糖蛋白(在鸡蛋清中有几种存在形式),每分子抗生物素蛋白有四个生物素结合部位,最近的研究表明生物素结合位点在该蛋白的疏水

裂隙中。抗生物素蛋白的生物学功能尚不清楚,但常食生鸡蛋者会导致生物素缺乏。

抗生物素蛋白可与某些阴离子型染料结合,如 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA),其结合位点与生物素结合位点相同,但这些染料的结合要弱得多(生物素的 $K_d=10^{-15}$, HABA 的 $K_d=5.8\times 10^{-8}$),而 HABA 自身在紫外光区有吸收峰, $\lambda_{\max}=348\text{nm}$,当 HABA 与抗生物素蛋白形成复合物时,其 λ_{\max} 移向 500nm ,此变化就是光谱测量的基础。当波长选在 500nm 时,自由态和结合态的 HABA 的摩尔消光系数分别为 600 和 34500。

二、试剂

纯净的抗生物素蛋白试剂:用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.0$) 配成 0.2mg/ml 的蛋白溶液。

HABA 溶液:用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.0$) 配制 0.56mmol/L 的 HABA 溶液(HABA 的分子量为 242.2)。

生物素溶液:用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.0$) 配制 0.4mmol/L 的生物素溶液(生物素的分子量为 244.3)。

待测溶液:配制一定浓度的纯抗生物素蛋白溶液和一定浓度的含其它杂蛋白的抗生物素蛋白溶液。

三、操作方法

1. 以 2ml 蒸馏水作为空白对照。
2. 取 1ml HABA 和 1ml H_2O 混匀,于 500nm 波长下测其 A_{500} ,以 2ml H_2O 作空白对照。
3. 取 1ml HABA 与 1ml 纯抗生物素蛋白溶液混匀,测其 A_{500} ,记录下结果,在此样品中添加 $5\mu\text{l}$ 的生物素溶液,然后用取样器吹气泡混匀,再测其 A_{500} ,记下结果。再向该比色皿的样品溶液加 $5\mu\text{l}$ 的生物素溶液,如上法混匀,测其 A_{500} ,如此重复下去,直到其 A_{500} 值不再发生变化为止。

4. 取 1ml HABA 与 1ml 未知浓度的抗生物素蛋白溶液混匀,测其 A_{500} ,后续步骤重复上述第 3 步,即每次加 5 μ l 生物素溶液混匀后,测 A_{500} ,这样可获得第二组数据。

5. 用考马斯亮蓝法测定未知浓度的杂抗生物素蛋白溶液中的总蛋白浓度,以 mg/ml 表示。

四、结果与思考题

1. 以 A_{500} (作 y 轴)对生物素的添加量(μ g)(作 x 轴)作图,绘出滴定曲线图。

2. 若一个抗生物素蛋白单位定义为结合 1 μ g 生物素的量,那么在纯和杂抗生物素蛋白溶液中各具多大活力(U/mg)?

3. 你所得图形中的交叉点有何意义?

4. 影响 HABA 结合的因素是什么?

5. 若以 1cm 光径的比色杯测量时,计算 0.28mmol/L HABA 溶液的 A_{500} 。

6. 利用生物素添加到 HABA 溶液产生的 ΔA_{500} ,计算出 HABA 结合部位被 HABA 占据时的浓度。

实验四十四 血红素的光吸收测定

一、原理

血红素是血红蛋白的辅基,也是多种卟啉类药物的前体。在碱性条件下,血红素与吡啶反应转变成还原性的吡啶血色原,可以进行光吸收测定。该方法操作简便、快速,结果可靠,是一种很理想的测定血红素含量或纯度的方法。

二、试剂

标准氯化血红素(含量 99%以上, $MW=652.0$);样品氯化血红素;连二亚硫酸钠;碱性吡啶溶液[0.1mol/L NaOH-30%(V/V)吡啶液]。

三、操作方法

1. 标准曲线制作

准确称取标准氯化血红素 10mg,用碱性吡啶溶液溶解并定容至 50ml。取 8 支试管,分别准确吸取上述溶液 0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50 和 1.75ml,用碱性吡啶溶液稀释至 12.5ml,终浓度分别为 0、4、8、12、16、20、24 和 28 $\mu\text{g/ml}$ 。向每支试管加入少许(保证过量)连二亚硫酸钠,并摇匀,立即于 557nm 处测定其吸光度。以标准液的浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制出标准曲线。

2. 样品的测定

准确称取样品氯化血红素 10mg,用碱性吡啶溶液溶解,并定

容至 50ml。取 1ml 再稀释至 12.5ml。加入连二亚硫酸钠并摇匀，立即于 557nm 处测定吸光度。

四、结果

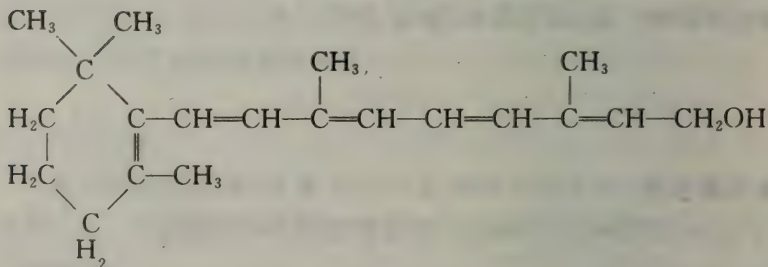
根据样品的吸光度，从标准曲线查出实际的含量。样品氯化血红素的纯度可用下面公式计算。

$$\text{样品氯化血红素 \%} = \frac{\text{样品实际含量}}{\text{样品配制浓度}} \times 100\%$$

实验四十五 维生素 A 的比色测定

一、原理

维生素 A 属于脂溶性维生素,其结构式如下:



维生素 A 在氯仿溶液中能与三氯化锑生成不稳定的蓝色物质,此反应称为 Carr-price 反应,可用于维生素 A 的定性鉴定和定量测定,所生成颜色的深浅与溶液中维生素 A 的量成正比,在一定时间内用分光光度计于 620nm 波长下测定其程度。

二、试剂

KOH 溶液:将 500g KOH 溶于 500ml 蒸馏水中;

乙醚:用前需检查是否含有过氧化氢,若有则必需重蒸;

乙醇:乙醇应经脱醛处理;

无水硫酸钠、酚酞指示剂、氯仿、醋酸酐;

20%~25%三氯化锑(SbCl₃)氯仿溶液:20~25g SbCl₃ 溶于

100ml 氯仿中,棕色瓶避光储存。

维生素 A 醋酸酯或维生素 A 标准油剂。

三、操作方法

维生素 A 极易被光破坏,实验应在暗室中进行。

1. 维生素 A 标准曲线的制作

称取一定量的标准维生素 A,置于容量瓶中用氯仿溶解,配成 100IU/ml 的标准液,再用氯仿稀释成不同的浓度(如 10,20,30,40,50,60,70,80,90,100IU/ml)的一系列标准液。

取比色管,将 10ml 氯仿装入一个比色管中,置于比色架的光路上,将 1ml 的氯仿和一系列标准液装入对应的比色杯中,其中各加一滴醋酸酐,用 10ml 氯仿于 620nm 条件下调零,立即将光路移至另一比色管,迅速加入 9ml SbCl_3 液,在 6 秒内测光密度值,依次测量各管。

2. 样品测定

这里采用研磨法测维生素 A 含量。

准确称取样品(2~5g),置于研钵内,加入 3~5 倍样品重量的无水硫酸钠,仔细研磨至样品中的水分完全被吸收,两者混匀为止。

小心将上述研磨物转移至带塞的锥形瓶中,准确加入 50~100ml 乙醚,盖好塞子,用力摇 2 分钟,使样品的维生素 A 全部溶于乙醚中,将锥形瓶置于冰水中 1~2 小时,直到乙醚液澄清为止。

准确吸取乙醚液 2~5ml,放入比色管中,70~80℃ 水浴上抽气蒸干,立即加入氯仿 1ml 溶解残渣,再加 1 滴醋酸酐和 9ml SbCl_3 液,混匀,在 6 秒内测其光密度值。

四、结果

1. 以维生素 A 的含量为横坐标(国际单位),光密度值为纵坐标,画出标准曲线。

比色管 编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
内含物	10ml 氯仿	1ml 氯仿 +9ml SbCl_3	1ml 标准液和 9ml SbCl_3								
维生素 A 含量(IU)	0	0									
OD_{620}											

2. 据所测的光密度值从标准曲线上查出待测管中维生素 A 的国际单位数,再据稀释关系求出样品中维生素 A 的量。

五、说明

1. 用三氯醋酸代替 SbCl_3 作显色剂也可测定维生素 A。三氯醋酸液的制备如下:取 50 克三氯醋酸(AR)溶于 25ml 新蒸馏的无醇氯仿中(现用现配)。测定时加样液 1ml,然后加三氯醋酸液 2ml,在 620nm 波长下测光密度值。其它各项操作用三氯化锑法。

胡萝卜素对维生素 A 的测定有一定的干扰作用。

2. 乙醚中过氧化氢检查法:取 5ml 乙醚于试管中,加约 1ml 50%碘化钾液,振摇 1 分钟,若乙醚中含有过量过氧化氢,则将 KI 中的碘氧化,放出游离碘,水层呈黄色,如无明显黄色,可加 1 滴 1%淀粉液,如有过氧化氢则水层呈蓝色。

3. 乙醇中醛的检查法:于试管中加入 2ml 氧化银氨液(加浓氨液于 50% AgNO_3 中直到氧化银的沉淀重新溶解,加入 10% NaOH 数滴,如发生沉淀,再加浓氨液使其溶解)。加几滴蒸出的乙醇摇匀,加入少量 10%NaOH 加热,若乙醇中无醛,则没有银沉淀,否则有银镜反应。



4. 氯仿分解物的检查法:氯仿在空气中易受氧的作用生成氯

化氢和光气：



检查时取少量氯仿于试管中，加少许水振摇之，使 HCl 溶于水层，加几滴 AgNO_3 液，如有白色沉淀即说明氯仿中有分解物产生。

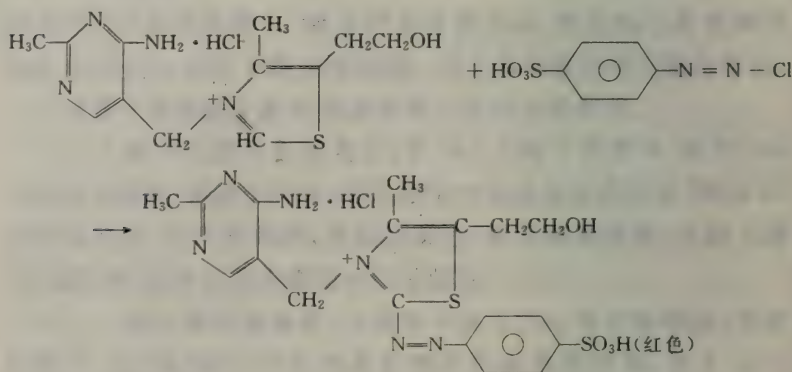
实验四十六 维生素 B₁(硫胺素)的测定

一、原理

维生素 B₁(又称硫胺素)属水溶性维生素,其分布广泛,谷类种子表层中含量尤为丰富,麦麸、米糠和酵母均是维生素 B₁ 的良好来源。其鉴定方法主要如下:

1. 重氮苯磺酸反应

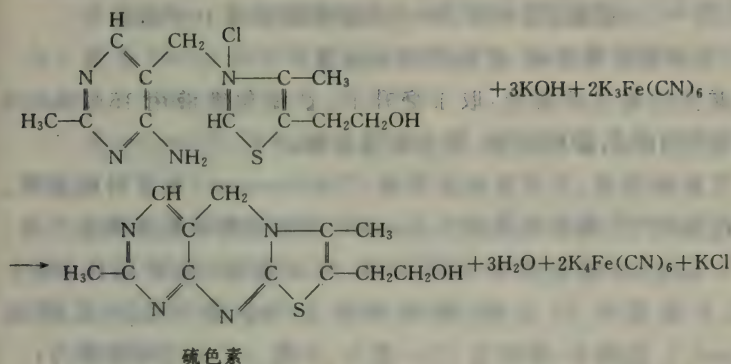
维生素 B₁ 在碱性条件下与重氮化对氨基苯磺酸作用产生红色,加入少量甲醛可使红色稳定。本反应不很灵敏,特异性也低,但操作简单迅速。



2. 荧光反应

硫胺素在碱性条件下与铁氰化钾作用可生成一种蓝色荧光化合物——胱氨硫胺素(硫色素、硫胺荧),该反应非常灵敏。在标准条件下,如果不存在其它荧光物质,溶液的荧光强度与硫胺素的浓度成正比,若样品中含杂质过多,应经离子交换剂处理,使硫胺素

与杂质分开。



二、试剂

1. 重氮化氨基苯磺酸溶液

4.5g 氨基苯磺酸溶于 45ml 37% HCl 中, 将其定容到 500ml, 此为 A 液。

将 2.5g NaNO_2 溶于蒸馏水中, 定容到 500ml 此为 B 液。

取 A、B 两液各 1.5ml 于 50ml 容量瓶中, 冰浴 5 分钟, 再加 6ml B 液, 混匀后再冰浴 5 分钟, 定容至 50ml, 冰浴中保存。新鲜配制。此试剂于稀释后 15 分钟到 24 小时内有效。

2. 碳酸氢钠碱性溶液

氢氧化钠 20g 溶于 600ml 水中, 加 28.8g NaHCO_3 , 混匀后定容到 1000ml。

3. 其它试剂

0.05mol/L H_2SO_4 溶液、40% 甲醛、维生素 B_1 溶液 (1mg/ml)、无水硫酸钠、15% NaOH 溶液、0.1mol/L HCl 溶液、2.5mol/L 醋酸钠溶液、95% 酒精;

丁醇: 114~118°C 重蒸丁醇; 也可用异丁醇

25% 氯化钾液;

25% 酸性氯化钾溶液: 8.5ml 浓盐酸 (比重 1.19) 用 25% 氯化

钾液稀释至 1000ml;

3%~5%醋酸:用水将 30ml 冰醋酸稀释到 1000ml;

1%铁氰化钾溶液:棕色瓶暗处冷藏;

碱性铁氰化钾溶液:取 1 毫升 1%铁氰化钾液用 15%NaOH 液稀释到 15ml,新鲜配制,避免阳光直射;

淀粉酶溶液:可用高峰淀粉酶(Takadiastase)和淀粉酶制剂。新鲜配制成 2%酶溶液或用 2.5mol/L 醋酸钠溶液配成酶悬浮液;

0.1mg/ml 硫胺素标准贮备液:将硫胺素(粉状晶体)置于 CaCl_2 干燥器中 24 小时,精确称取 100mg 溶于 25%乙醇或 0.01mol/L 盐酸中,稀释至 1000 毫升,冷藏,5℃以下可存数月;

0.1μg/ml 硫胺素标准液:将贮备液稀释 1000 倍,以冰醋酸调至 pH4.5,新鲜配制;

0.1mg/ml 硫酸奎宁液:用 0.05mol/L 硫酸溶解 100mg 硫酸奎宁至 1000ml,棕色瓶冷藏保存。若溶液变浑,应重配;

0.15μg/ml 硫酸奎宁液:将 1.5ml 硫酸奎宁贮备液(0.1mg/ml)用 0.05mol/L 硫酸释至 1000ml。此液可用标准荧光玻璃代替;

活性人造沸石:使用 30~50 目及 60~80 目的混合体,若溶液中含量高于 7 微克时,可用 60~80 目。

4. 特殊仪器

盐基交换管(长 80mm,内径 8mm,上有 50ml 容量钟形罩)、分液离心管(25~30ml)、荧光计(Coleman 12 型)。

三、操作方法

1. 重氮苯磺酸反应的定性检测

将 1.2ml 碱性试剂和 0.5ml 重氮化氨基苯磺酸液混匀,加 1 滴 40%甲醛液,再向此混合液立即加入维生素 B_1 (1mg/ml) 试液(约 pH5)1ml,即产生红色,此红色在 30~60 分钟内逐渐加深。

2. 维生素 B_1 的定量测定

(1)提取

精确称取一定量磨细的样品(硫胺素含量在 10~30 微克范围内),置于 100ml 锥形瓶中,加入 75ml 0.1mol/L 盐酸,在沸水浴上加热半小时,经常摇动,使之均匀。

用 2.5mol/L 醋酸钠液调 pH 至 4.5(以溴甲酚绿为外指示剂)。

冷却提取液至室温,再加入淀粉酶混悬液以游离结合态的硫胺素,37℃保温过夜或 45~50℃保温 3 小时。冷却至室温,用水释至 100ml,混匀后过滤,弃去最初几毫升。

(2)纯化

将人造沸石装入盐基交换管中,约 1/3 体积,用蒸馏水洗。

取 25ml 提取液加入到上述盐基交换管中,控制流速 60 滴/分钟左右。

用热水洗盐基交换管三次,每次约 10ml,弃去洗液。

用约 10ml 酸性氯化钾热溶液洗脱,待完全滤下后,再加 10ml,收集洗脱液于 25ml 容量瓶中,冷却后用酸性氯化钾释至刻度。

取 25ml 0.1 μ g/ml 硫胺素标准液,用前述步骤也进行纯化。

(3)氧化

取两个分液离心管作“空白”和“测定”标记,各加入 5ml 纯化液。在测定管中加入 3ml 碱性铁氰化钾液,在空白管中加入 3ml 15%NaOH 液。两管各加 15ml 丁醇,剧烈振摇 90 秒钟。

用标准硫胺素纯化液代替样品纯化液,同上述重复操作步骤。

将上述 4 个分液离心管离心,使丁醇与碱液分层。小心将各管的下层碱液弃去,并各加 1~2 克无水硫酸钠,摇匀,离心。

(4)用荧光计分别测定各管丁醇提取液的荧光度。用硫酸奎宁应用液校正荧光计,使电流指针位于一定数字上。

四、结果

按下式计算样品中硫胺素的含量:

$$\text{每克样品内所含硫胺素量}(\mu\text{g}) = \frac{T_u - B_u}{T_s - B_s} \times 0.1 \times \frac{25}{V} \times \frac{100}{W}$$

式中: T_u 为样品液的发光度

B_u 为样品空白液的发光度

T_s 为标准溶液的发光度

B_s 为标准空白溶液的发光度

W 为样品的重量

V 为所用已提纯的样品量(毫升)。

五、说明

1. 取样时因各种材料中硫胺素的含量不一,据经验,蔬菜、水果和鱼类可取样 15~20g,谷类和肉类 2~5g,豆类和干果类取 5~10g。

2. 酶的用量:动物性食品和干植物样品按每克加 20 毫克酶计,新鲜蔬菜水果按每克加 3 毫克酶计。

实验四十七 维生素 C 的定量测定

(2,6-二氯酚靛酚滴定法)

一、原理

还原型抗坏血酸能还原染料 2,6-二氯酚靛酚钠盐,本身则氧化成脱氢抗坏血酸。在酸性溶液中,2,6-二氯酚靛酚呈红色,被还原后呈无色。且在酸性环境中,干扰物质与染料反应非常慢,而抗坏血酸与之反应的特异性有一定程度的提高。当抗坏血酸全部被氧化后,稍多加一些染料,使滴定液呈淡红色,即为终点。如无其它干扰物质存在,样品提取液所还原的标准染料量与样品中所含的还原型抗坏血酸量成正比。

二、试剂

2%草酸溶液:草酸 2g 溶于 100ml 蒸馏水;

1%草酸溶液:溶 1g 草酸于 100ml 蒸馏水;

标准抗坏血酸溶液:准确称取 50.0mg 纯抗坏血酸,溶于 1%草酸溶液,并稀释至 500ml。贮棕色瓶,冷藏,最好临用时配制;

0.1% 2,6-二氯酚靛酚溶液:溶 50mg 2,6-二氯酚靛酚于 300ml 含有 104mg NaHCO_3 的热水中,冷却后加水稀释至 500ml,滤去不溶物,贮棕色瓶内,冷藏(4℃约可保存一星期)。每次临用时,以标准抗坏血酸溶液滴定。

三、操作方法

1. 提取

水洗净整株新鲜蔬菜或松针,吸干表面水分。然后称取 20g,加 2%草酸 100ml 置组织捣碎机中打成浆状。取浆状物 5.0g,倒入 50ml 容量瓶中,以 2%草酸溶液稀释到刻度,静置 10 分钟,过滤(最初数毫升滤液弃去)之滤液备用或离心取上清备用。

2. 滴定

(1)标准液滴定:准确吸取标准抗坏血酸溶液 1.0ml(含 0.1mg 抗坏血酸),置 100ml 锥形瓶中,加 9ml 1%草酸,微量滴定管以 0.1% 2,6-二氯酚靛酚滴定至淡红色,并保持 15 秒钟即为终点。由所用染料的体积计算出 1ml 染料相当于多少 mg 抗坏血酸。

(2)样液滴定:准确吸取滤液或上清液三份,每份 10.0ml 分别放入二个 100ml 锥瓶中,同前法滴定。

四、说明

滴定速度宜迅速,一般不超过 2 分钟。滴定所用的染料不应少于 1ml 或多于 4ml,如果样品含抗坏血酸太高或太低时,可酌量增减样液。

五、计算

$$\frac{V \times T}{W} \times 100 = 100g \text{ 样品中含抗坏血酸 mg 数;}$$

V=滴定时所用去的染料 ml 数;

T=1ml 染料能氧化抗坏血酸 mg 数;

W=10ml 样液相当于含样品的克数。

分离纯化核酸的一般原则

核酸的分离提取和纯化是核酸研究中十分关键的步骤。核酸的分离提取并没有统一的办法,而是根据核酸来源不同和种类不同来决定选用什么方法,但总的要求是去除蛋白质等各种杂质,保持核酸不发生变性或降解,最终能得到完整且具天然生物活性的核酸制品。

细胞内的 DNA 和 RNA 都是以核蛋白的形式存在,且两者在提取过程中常混在一起,同时细胞内还有其它许多杂质,如蛋白质、多糖和脂质,加之核酸在细胞内含量较少,所以提纯核酸样品难度较大。

核酸分子尤其是 DNA 很不稳定,易受高温、强酸、强碱和其它化学因素以及机械力的作用。使 DNA 变性或降解而得不到完整分子,而且在生物细胞内同时还含有分解 DNA 和 RNA 的各种核酸酶,如不及时去除或抑制这些核酸酶的活力,则在分离提取过程中核酸就会被这些酶降解,最终甚至得不到核酸制品,为此在分离提取的操作过程中应注意以下几点:①防止化学因素的降解,避免强酸和强碱等变性因素;②防止物理因素的降解,避免高温、机械力的作用,在低温和 pH5~9 的条件操作,同时操作时动作轻缓,搅拌要温和,避免用细口滴管吸放 DNA 等;③防止核酸酶的作用,特别是在制备 RNA 时要防止 RNA 酶的降解作用,因为 RNA 酶不需要二价金属离子,一般用螯合剂很难抑制,且此酶到处存在,极易污染。为防止 RNA 酶的作用,一方面所用器材和试剂必须经高温高压消毒,同时尽早去除蛋白和去尽蛋白,加入 RNA 酶的抑制剂,如 SDS,皂土等。对 DNA 酶来说,因其活性需二价金属离子,只要加入 EDTA 或柠檬酸钠等就可抑制其活性。

核酸分离提取和纯化的主要步骤和方法

分离提取核酸的主要过程,一般先要经过细胞组织的破碎,然后解聚核蛋白并使蛋白质变性,除去蛋白和多糖等杂质,抽提和沉

淀核酸等步骤。实际应用时要据所需纯化的核酸性质来确定纯化的方法。

破碎细胞的方法有物理法,如超声波、匀浆和组织捣碎等,化学和生化的方法,如去污剂,蛋白质变性剂和溶菌酶等。对于动植物材料,往往先经液氮速冻,然后在低温下匀浆或捣碎,这样既避免了核酸酶的作用,又可使坚硬的植物组织捣碎。对于细菌来说,通常先用溶菌酶去壁,再用去污剂溶解膜蛋白和脂肪达到破膜的目的。

在生物体内,DNP 和 RNA 通常都与蛋白质结合形成核蛋白复合物(分别称为 DNA 蛋白 DNP 和 RNA 蛋白 RNP),利用在 0.14mol/L 盐溶液中 RNP 溶解而 DNP 溶解度最小这一性质将二者分开。通常是将细胞提取物用 1.0mol/L NaCl 溶解,然后稀释到 0.14mol/L,则 DNP 沉淀,离心所得沉淀即为 DNP。

在核酸提纯过程中,除去蛋白质是很关键的一步。要除去蛋白质首先是使核蛋白解聚和蛋白质变性,常用的方法有:浓盐法(10%NaCl),去污剂法和有机溶剂法等。目前常用的去污剂为十二烷基磺酸钠(SDS),为一种阴离子去污剂,同时又是蛋白质的强变性剂,它可以和蛋白质分子上阳离子结合形成复合物,从而达到解聚核蛋白和使蛋白质变性的目的,一般用 0.5%左右的 SDS 搅拌约 3 小时,就能使蛋白质充分变性。酚和氯仿则是常用的有机溶剂性质的蛋白质变性剂。当这些有机溶剂与核酸蛋白的水溶液振荡混合时,原来在水溶液中的蛋白质在与酚、氯仿接触后发生变性而与核酸分开,离心分层后,变性并凝聚的蛋白层则处于“相的界面层,而核酸则仍留在水溶液中。一般操作是先用酚抽提去蛋白一次,取出水相再用 1:1(V/V)的酚:氯仿抽提,最后用氯仿再抽提去除蛋白,这样不仅去蛋白效果好,而且还可把微量的酚从核酸样品中去掉。此外,去除蛋白质还可以用蛋白酶的方法,如蛋白酶 K,此酶的特点是水解蛋白质的能力强,在有 SDS 和 EDTA 的存在下仍有活力。

去除了蛋白质后的核酸溶液需进一步使其沉淀和浓缩。沉淀法通常用乙醇,在含有适当浓度的一价阳离子(如 0.25mol/L 醋酸钠或 0.1mol/L NaCl 或 2.0mol/L 醋酸铵等)的核酸溶液中加入 2 倍体积的预冷乙醇($95\%\sim 99\%$),混匀后在 -20°C 放置 $30\sim 60$ 分钟就可使核酸充分沉淀,离心后所得的核酸沉淀可按需要溶解成一定浓度的核酸溶液。

上述方法得到的粗品核酸若需进一步纯化,可根据核酸的理化性质,如分子量,带电性,溶解度,碱基组成、碱基顺序和分子构象等选用特定的方法,常用的方法包括超离心法,凝胶电泳法、各种柱层析法以及分子杂交等。如用蔗糖密度梯度离心可将分子量大小不等的线性 DNA 分开,它可将分子量相等而构象不同的均一 DNA(如某些病毒 DNA)分开;用氯化铯密度梯度离心可将双股 DNA 和单股 DNA 分开;用羟基磷灰石(HA)柱层析或甲基化白蛋白硅藻土(MAK)柱层析可将变性 DNA 和天然 DNA 分开;特异亲和层析和免疫法分离 mRNA。

核酸的含量测定方法主要有紫外吸收法,定糖法和定磷法。核酸纯度的鉴定可以通过 260nm 和 280nm 的紫外吸收比值得到初步确认,再进一步可用琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳法确认。

经分离纯化的核酸制剂为了防止变性和降解,通常将 DNA 溶解于 pH8 的 10mmol/L Tris- 1mmol/L EDTA 的 TE 缓冲液中,在 4°C 下可保存半年。此外也可将 DNA 以沉淀形式保存在 75% 乙醇中,在 -20°C 中可以长期保存。而 RNA 则可以冻成干粉的形式或在含 2% 的醋酸钠的乙醇中低温保存。

实验四十八 核酸的定量测定 ——定磷法

一、原理

生物体内有许多含磷化合物,如核酸(RNA,DNA)、磷脂、ATP等。磷的测定方法很多,但在生化研究中以比色法的应用最为广泛,该法量微、快速、准确。

核酸和核苷酸均为含磷化合物,纯的核酸含磷量为9%(RNA含磷量为8.5%~9.0%,DNA则含9.2%的磷)。从核酸中测得了总磷量,就可知样品中核酸的量,即每测得1毫克有机磷,就表示有11毫克的核酸。这就是定磷法的理论依据。

在测定过程中,浓硫酸与核酸共热使其转变为无机磷(此为消化过程),而无机磷与定磷试剂中的钼酸铵在酸性条件下反应生成磷钼酸铵,它在还原剂作用下被还原成深蓝色的钼蓝(高价钼被还原成低价钼),钼蓝在660nm处有最大光吸收峰。在一定的磷浓度范围内,蓝色的深浅与磷含量成正比。

生物有机磷材料中有时含有无机磷杂质,为了消除无机磷的影响,应同时测定样品中的总磷量和样品中的无机磷含量(样品未经消化而直接测定的含磷量)。从总磷量中减去无机磷量,才是样品中的真正磷含量。

核苷酸的消化与核酸一样。此外嘌呤类核苷酸可用1.5mol/L HCl 100°C水解1小时脱磷;嘧啶类核苷酸可用10mol/L H_2SO_4 消化1~2小时脱磷。

二、试剂

1. 标准磷试剂(含磷 $5\mu\text{g}/\text{ml}$): 准确称取恒重(105°C)的 KH_2PO_4 0.4389g, 用水定容到 100ml, 此液的浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$, 用前再稀释 200 倍, 即为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2. 定磷试剂:

① 6mol/L 硫酸: 取 17ml 浓硫酸(比重 1.84)缓缓加入 83ml 水中。

② 2.5% 钼酸铵: 2.5g 钼酸铵溶于 100ml 水中。

③ 10% 抗坏血酸溶液: 取 10g 抗坏血酸溶于 100ml 水中。棕色瓶 4°C 贮存。溶液应为淡黄色, 深黄或棕色则不能用。

临用前, 将 6mol/L 硫酸: 2.5% 钼酸铵: 10% 抗坏血酸液: 水 = 1: 1: 1: 2(V/V) 混匀即可, 用棕色瓶贮存。

3. 催化剂: 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 硫酸钾(K_2SO_4) = 1: 4 (W/W), 研成细末。

4. 30% 过氧化氢、浓硫酸。

三、操作方法

1. 制作磷标准曲线:

取标准磷溶液($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0ml, 用水补足到 3ml, 含磷量分别为 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, $15\mu\text{g}$, 加定磷试剂 3ml 后摇匀, 45°C 置放 20 分钟, 测 OD_{660} 。以含磷量为横坐标, OD_{660} 为纵坐标制作标准曲线。

2. 核酸中总磷量的测定:

取 1ml 被测样品液(约含 2.5~5mg 核酸, 也可取固体样品), 置于消化瓶中, 加入 1ml 浓硫酸及 50mg 催化剂, 在消化炉上加热至发白烟, 样品由黑变成淡黄色, 取下稍冷, 加数滴 30% 过氧化氢液, 继续加热至溶液呈无色可淡蓝色为止, 稍冷却, 加 1ml 水, 于 100°C 加热 10 分钟使焦磷酸转变为磷酸。冷至室温, 用蒸馏水定

容到 50ml。与样品消化的同时做空白对照,空白瓶中不加样品,用水代替,其它完全相同。

取稀释后的消化液 1ml,加水 2ml,定磷试剂 3ml,摇匀,45°C 放置 20 分钟,于 660nm 处读取 OD 值。空白对照同样操作。

3. 样品中无机磷含量测定:

取未消化的核酸样品液 1ml 用水定容到 50ml。从中取 1ml,加 2ml 水,3ml 定磷试剂,摇匀后保温,然后读 OD₆₆₀。

四、结果

首先制作标准磷曲线。以消化和未消化的样品中的 OD₆₆₀ 从标准曲线上查出各自对应的磷含量。

计算样品中核酸含量,按下式进行:

$$\text{样品中核酸含量}\% = \frac{\frac{\text{有机磷量}(\mu\text{g}) \times D \times 11}{\text{测定时取样量}(\text{ml})}}{\text{样品重量}(\mu\text{g})} \times 100$$

其中:有机磷量(μg) = 总磷量 - 无机磷量

D 为稀释倍数,即 $\frac{\text{消化后定容体积}(\text{ml})}{\text{消化时取样体积}(\text{ml})}$

实验四十九 核酸的定量测定

——定糖法

RNA 含有核糖, DNA 含有脱氧核糖, 二种糖有不同的颜色反应, 经过呈色反应后, 所呈现的颜色深浅在一定范围内与样品中所含糖量成正比。由于常用的测糖法只能测定核酸中与嘌呤相连接的糖, 而不同来源的核酸含嘌呤、嘧啶的比例各不相同, 故把测定的糖量来统一换算成核酸的含量不很正确。一般要求用与被测核酸同来源的纯核酸作标准曲线, 通过标准曲线再查出被测样的核酸含量, 这样可以使误差减到最小。

定糖法多用于大分子核酸的测定, 但准确性和灵敏度较差, 干扰物质亦较多。

I. RNA 的定量测定

一、苔黑酚法

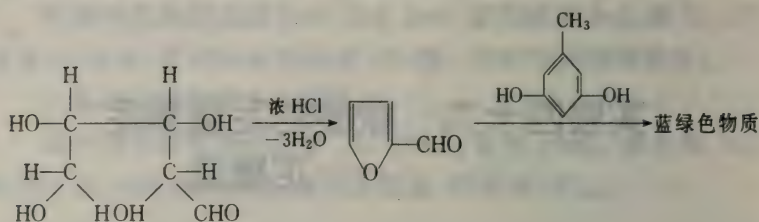
1. 原理

RNA 和浓盐酸共热生成嘌呤碱基、核糖和嘧啶核苷酸。而核糖在浓酸中脱水环化生成糠醛, 糠醛与苔黑酚(3,5-二羟甲苯)生成绿色物质, 在 670nm 处有最大光吸收峰。RNA 浓度在 10~100 μ g/ml 范围内其含量与光密度值成正比。

反应式如下:

样品中有蛋白质或粘多糖或大量 DNA 时对测定有干扰。其

中蛋白质可用 5% 三氯乙酸沉淀后再行测定。有大量 DNA 存在时, 加入适量的 $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 可减小 DNA 的干扰。



2. 试剂

苔黑酚试剂:取 20g 苔黑酚, 13.5g 硫酸铁铵用蒸馏水配成 500ml, 此为储备液, 4°C 保存。用前取储备液 2.5ml, 加 12mol/L HCl 41.5ml, 再加蒸馏水到 50ml, 摇匀, 即为苔黑酚溶液。

标准 RNA 溶液:取商品 RNA 配成 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。所用 RNA 最好与被测样同源。其准确含量可用定磷法精确定量。

3. 操作方法

标准曲线的制作:取标准 RNA 溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml, 用水补足到 1ml。加苔黑酚溶液 3ml, 置沸水浴中保温 20 分钟后立即冷却, 测各管 OD_{670} 。以 OD_{670} 值为纵坐标, 纯 RNA 量 (μg) 为横坐标, 制作标准曲线。

样品中 RNA 的测定:取样品液 1ml, 加苔黑酚溶液 3ml, 其余操作同标准曲线的制作, 测其 OD_{670} 。空白以水代替样品。最后从标准曲线上查出样品液中 RNA 的含量。

二、改良苔黑酚法

1. 原理

其原理与苔黑酚法相同, 只不过本法用铜离子代替苔黑酚法中的铁离子作催化可使反应灵敏度提高一倍以上。待测溶液中 RNA 的浓度在 $5\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 其光密度值与 RNA 含量成线性关系。

2. 试剂

苔黑酚试剂:取 5g 苔黑酚溶于 10ml 95%乙醇中,此溶液为深红色,称为贮备液;取 0.75g 氯化铜($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于 500ml 12mol/L HCl 中,溶液呈深黄色。用前取贮备液 2ml 与 100ml 铜离子溶液混匀即可。

RNA 标准溶液:用 1mmol/L NaOH 作溶剂,将 RNA 配成 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

待测 RNA 溶液:其浓度控制在 20~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内。

3. 操作方法

标准曲线的制作:取试管编号,分别加 RNA 标准溶液(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)0,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0ml,用水补足到 2ml。各管中均加入苔黑酚-铜离子试剂 2.0ml,摇匀后于 100°C 保温 35 分钟,冷却后测 OD_{670} 。以 OD_{670} 为纵坐标, RNA 含量(μg)为横坐标制作标准曲线。

样品中 RNA 含量的测定:取待测溶液 2ml,加苔黑酚-铜离子试剂 2ml,以后操作同标准曲线的制作方法,最后测其 OD_{670} ,从标准曲线上查出待测样中 RNA 的含量。

II. DNA 的定量测定

一、二苯胺法

1. 原理

DNA 酸解后生成嘧啶核苷酸、嘌呤、磷酸和脱氧核糖。脱氧核糖在酸性条件下脱水生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛,它能与二苯胺反应生成蓝色复合物,其最大光吸收在 595nm,可用比色法测定。样品中 DNA 浓度在 50~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,其光密度值与 DNA 含量成正比。样品中若有少量 RNA 对测定结果影响不大,但镁盐、蛋白质、多糖及其衍生物、芳香醛、羟基醛对测定有干扰。

2. 试剂

二苯胺试剂:取 1g 二苯胺溶于 98ml 冰醋酸中,加 18mol/L H_2SO_4 2ml,冰箱 4℃ 保存,当天使用。

DNA 标准溶液,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,可用水或 5mmol/L NaOH 作溶剂。其准确含量需用定磷法确定。

DNA 待测溶液:可配成 100~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 操作方法

标准曲线的制作:取试管编号,分别加 DNA 标准溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml,用水补足到 1.0ml,再各加二苯胺试剂 2.5ml,摆匀后置 100℃ 水浴中保温 10 分钟,冷却后测 OD_{595} 。以 OD_{595} 为纵坐标,纯 DNA 含量(μg)为横坐标,绘制出标准曲线。

待测样品中 DNA 的测定:取 DNA 待测液 1ml,加二苯胺试剂 2.5ml,其余操作同上,水作空白,测其 OD_{595} 。从标准曲线上查出 DNA 的含量。

二、改良二苯胺法

1. 原理

其原理同二苯胺法。加入乙醛增加二苯胺法测定 DNA 时的发色量,乙酸乙酯可把反应中形成的蓝色产物抽提到有机相中进行浓缩,灵敏度大大提高。样品中 DNA 浓度在 10~150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,其光密度值与 DNA 的含量成线性关系。

2. 试剂

4% 二苯胺冰醋酸溶液:取 4g 重结晶的二苯胺加少量冰醋酸微热溶解后,加冰醋酸至 100ml,当天使用。

20% 过氯酸,取 71.4ml 分析纯 70% 过氯酸(HClO_4)加水至 250ml。

0.16 乙醛水溶液:取 0.4ml 40% 乙醛液加水至 100ml。

DNA 标准溶液,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

待测 DNA 溶液:20~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

乙酸戊酯。

3. 操作方法

标准曲线的制作:取试管编号,于各管中分别加入 DNA 标准溶液($100\mu\text{g}/\text{ml}$)0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.2,1.4,1.6 和 2.0ml,用水补足到 2.0ml,再各加入 2ml 20%过氯酸溶液,4ml 4%二苯胺溶液和 0.2ml 0.16%乙醛水溶液,充分摇匀后于 56°C 保温 1 小时,流动水冷却后,各管再加 2ml 乙酸戊酯,剧烈振荡,静置 5~10 分钟,或以 3000rpm 离心 1 分钟,使有机相与水相分开,测定有机相的 OD_{595} (可选用 0.5cm 光径的比色杯)。以 OD_{595} 为纵坐标, DNA 量(μg)为横坐标绘出标准曲线。

待测样中 DNA 含量的测定:取 DNA 待测溶液 2ml 进行反应,操作同上,最后同样测定 OD_{595} 。然后从标准曲线上查出其 DNA 含量。

实验五十 核酸的定量测定 ——紫外吸收法

一、原理

核酸及其衍生物、核苷酸、核苷、嘧啶和嘌呤均有紫外吸收的性质。其吸收高峰在 260nm 波长处。核酸的摩尔消光系统用 ϵ (P) 来表示, ϵ (P) 为每升溶液中含有 1 克原子核酸磷的光吸收值 (即 A 值) (见下表)。测得未知浓度核酸溶液的 A_{260} 值, 即可计算出其中 RNA 或 DNA 的含量。该法操作简便、迅速, 对样品无损。

核酸摩尔消光系数及相关值

	ϵ (P) (pH7, 260nm)	含磷量(%)	A_{260} (1 μ g/ml)
RNA	7700~7800	9.5	0.022~0.024
DNA-Na 盐 (小牛胸腺)	6600	9.2	0.020

蛋白质和核苷酸等也有紫外吸收。通常蛋白质的吸收高峰在 280nm 波长处, 在 260nm 处吸收值仅为核酸的 1/10 或更低, 因此对于含有微量蛋白质的核酸样品, 测定误差较小。RNA 的 260nm 与 280nm 吸收比值在 2.0 以上; DNA 的 260nm 和 280nm 吸收比值在 1.9 左右, 当样品中蛋白质含量较高时, 比值下降。若样品中

混有大量的蛋白质和核苷酸等紫外吸收物质时,应设法除去。

二、试剂

1. 钼酸铵-过氯酸沉淀剂:取 3.6ml 70%过氯酸和 0.25g 钼酸铵溶于 96.4ml 水中,即成 0.25%钼酸铵-2.5%过氯酸溶液。

2. 5%~6%氨水。

3. 测试样品:RNA 或 DNA 干粉。

三、操作方法

1. 准确称取样品若干,加入少量 0.01mol/L NaOH 调成糊状,再加适量水,用 5%~6%氨水调至 pH7.0,最后加水配成每毫升含 5~50 μ g 核酸的溶液,于紫外分光光度计上测定 A_{260} ,计算核酸浓度。

$$\text{RNA 浓度}(\mu\text{g/ml}) = \frac{A_{260}}{0.024 \times L} \times N$$

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/ml}) = \frac{A_{260}}{0.020 \times L} \times N$$

式中, A_{260} 为 260nm 波长处光吸收值;

L 为比色杯厚度,即光径,1cm;

N 为稀释倍数;

0.024 为每毫升溶液含 1 μ g RNA 的 A_{260} 值;

0.020 为每毫升溶液中含 1 μ g DNA 的 A_{260} 值。

2. 如果待测溶液中含有酸溶性核苷酸或可透折的低聚多核苷酸,需在测定时加钼酸铵和过氯酸溶液沉淀剂,去除大分子核酸,上清液的 A_{260} 值作为对照。

准确称取待测核酸样品 0.50g,加少量 0.01mol/L NaOH 调成糊状,再加适量水,用 5%~6%氨水调至 pH7.0,定容至 50ml。

取两支离心管,甲管加入 2ml 样品溶液和 2ml 蒸馏水,乙管加入 2ml 样品溶液和 2ml 沉淀剂,混匀,在冰浴上放置 30 分钟,以 3000rpm 离心 10 分钟。从甲、乙管中分别吸取 0.5ml 上清液,

用蒸馏水定容至 50ml,选光程为 1cm 的比色杯,于 260nm 波长处测 A_{260} 。

计算:

$$\text{RNA(或 DNA)浓度} = \frac{\Delta A_{260}}{0.024(\text{或 } 0.020) \times L} \times N$$

式中, ΔA_{260} 为甲管稀释液的 A_{260} 减去乙管稀释液的 A_{260} 值。

$$\text{核酸}\% = \frac{1\text{ml 待测液中测得的核酸微克数}}{1\text{ml 待测液中制品的微克数}} \times 100$$

在本实验中, 1ml 待测液中制品量为 $50\mu\text{g}$ 。

实验五十一 细胞核的分离

一、原理

细胞核是真核生物染色质和基因活动的场所。为了研究细胞核及其组成成分,如染色质、DNA 及核内小 RNA,研究核小体结构、基因表达及其调控过程,都需分离纯净的细胞核。对于分离的细胞核,要求形态完整,核内成分无渗漏,不污染细胞质成分,如核糖体、线粒体的污染,并有较高的得率。为此目的,在分离核的过程中应采取各种措施,如选用合适的 pH 和介质,加入一定种类的二价阳离子和去污剂,在低温条件下操作等,所有这些都是加强核膜韧性,消除核膜对细胞质成分的吸附,防止核的自溶作用等。

根据实验的需要可以选择不同的分离细胞核方法,通常采用的方法主要有以下几种:第一种方法是由 J. Chauveau 等(1956)提出的蔗糖水溶液法,它是基于细胞核的比重较大,在高密度介质中,在高速离心条件下被沉降下来,从而达到细胞核与其它细胞质成分分开的目的。其适用面广,所得核纯度较高,又保持生物活性。但不适于某些细胞(如肿瘤细胞、胸腺细胞、表皮细胞、精巢细胞等)的核分离,且需蔗糖量大,需高速离心机。第二种方法是柠檬酸水溶液法,它是由 Dounel 于 1963 年提出的,其优点是细胞其它成分的污染程度低,核破碎率低,能保证高分子量核酸的进一步提纯。第三种方法是有机溶剂法,经 Allfrey 改进,其特点是可以防止核内水溶性成分的渗漏,也能阻止细胞质的某些成分进入核内,但不能保持细胞核的正常形态,导致核内某些酶的失活,故常用于定量分析细胞核的生化成分及其它研究目的。以上几种方法各有优

缺点,可选择使用。

细胞核纯度的鉴定可从两方面进行,一是形态学观察,如光学显微镜或电子显微镜的利用;二是生物化学方法,如测定某些细胞质酶的活力(如过氧化氢酶、碱性磷酸酶、淀粉酶、脂酶等)。

本实验主要介绍水溶液作为介质分离细胞核的方法。

二、实验内容

(一)方法一:柠檬酸水溶液法

1. 原理

取组织在一定浓度的柠檬酸溶液中匀浆,通过差速离心,把比重较大的细胞核从细胞质成分和碎片的悬浮液中沉淀下来,然后通过蔗糖梯度离心,除去吸附于核膜上的细胞质颗粒物质,获得较纯净的细胞核。

柠檬酸能除去细胞质里的酸溶性蛋白,螯合二价阳离子以及抑制核酸酶,还有降低介质的 pH 值,减少核的破碎作用。柠檬酸浓度对分离细胞核的质量有较大影响,通常在较低 pH 时,可以得到较高纯度的细胞核,但过酸时可能引起细胞核成分的改变及酶活性的丧失。为了研究细胞核内的核酸时常用 pH4,甚至 pH2.5 的条件分离细胞核;若为了研究细胞核内的酶时,则需较温和的条件,如以 pH6~6.2 的极稀柠檬酸,分离细胞核。

该法简便有效,广泛采用。

2. 试剂

0.9%氯化钠溶液、25mmol/L 柠檬酸、0.25mol/L 蔗糖-25mmol/L 柠檬酸、0.88mmol/L 蔗糖-25mmol/L 柠檬酸。

后 4 种试剂可加甲苯磺酰氟(PMSF),浓度为 0.1mmol/L,可先配成 50mmol/L 的 PMSF 贮液:0.87g PMSF 用 100ml 的异丙醇或 95%乙醇溶解,用前按稀释比例加入到各试剂中。

RSB 溶液:10mmol/L NaCl, 3mmol/L CaCl_2 , 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5。

3. 操作方法

取饥饿 24 小时的动物(大白鼠),断颈杀死,取出肝脏,用冷生理盐水充分漂洗,用滤纸吸干液体,可冰冻(-20°C)保存或直接用于以下步骤。

肝脏去除脂肪和结缔组织后,加 10 倍体积的 25mmol/L 柠檬酸溶液,匀浆破碎细胞,再用 2~4 层纱布过滤。

滤液用 $1000\times g$ 离心 10 分钟,弃去上清。

沉淀用 25mmol/L 柠檬酸液重复洗涤一次。

该沉淀用玻璃匀浆器使之悬浮于 0.25mol/L 蔗糖-25mmol/L 柠檬酸液中(如 100ml),然后铺在离心管内 3 倍体积的 0.88mol/L 蔗糖-25mmol/L 柠檬酸溶液之上,以 $3000\times g$ 离心 10 分钟,可得较纯净的细胞核沉淀。

细胞核悬浮于 RSB 溶液中,经 $1600\times g$ 离心 10 分钟。重复洗涤二次,解除酸环境,获得较纯的细胞核,纯核悬浮于 RSB 溶液中, 4°C 能保持几天不失活。

若需长期保存,可将核悬浮于 0.01mmol/L EDTA-0.5mmol/L 二硫苏糖醇-5mmol/L MgCl_2 -25%甘油-50mmol/L Tris-HCl(pH7.4)的缓冲液中于 -70°C 保存数月。

(二)方法二:蔗糖水溶液法分离大鼠肝细胞核

1. 原理

肝脏组织在含有 Ca^{2+} 的蔗糖水溶液中匀浆后经一定浓度蔗糖梯度离心,可将比重大的细胞核沉淀下来。蔗糖既是高密度介质,又能防止细胞核自溶, Ca^{2+} 能减少细胞核的脆性,防止核自溶和集聚成团。

2. 试剂

生理盐水、0.32mol/L 蔗糖-4mmol/L CaCl_2 溶液、0.25mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 溶液、0.34mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 溶液、2.20mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 溶液。

以上溶液中均含 0.1mmol/L PMSF。

3. 操作方法

取 20g 肝脏组织在冰浴中剪碎,加 100ml 0.32mol/L 蔗糖-4mmol/L CaCl_2 液,匀浆,再用纱布过滤,滤液经 $600\times g$ 离心 10 分钟,弃上清。

沉淀加 50ml 0.25mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 使之悬浮,然后将该悬浮液铺在等体积的 0.34mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 液上,经 $1600\times g$ 离心 10 分钟,小心弃去上清。

核沉淀用 9 倍体积的 2.20mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 溶液悬浮,经 $45000\times g$ 离心 1 小时,纯核沉淀再用 0.34mol/L 蔗糖-3mmol/L CaCl_2 溶液悬浮,经 $600\times g$ 离心 10 分钟,得到纯净的细胞核沉淀。核可用 RSB 液漂洗后保存或备用。

实验五十二 染色质结构和组成分析

一、原理

真核生物 DNA 是以染色质形式存在,其结构的基本单元是核小体,该颗粒由 H2A, H2B, H3, 和 H4 几种组蛋白和一段长度可变(165~220bp)的 DNA 组成。八聚体组蛋白的外周缠以 DNA,这段 DNA 在真核生物中具有固定长度,即 146 碱基对(bp),也叫核心 DNA。连接两个核心颗粒间的 DNA 叫连接 DNA,它的长度可变性决定了核小核 DNA 的长度可变性。第五种组蛋白是 H1,它在核心颗粒之外,与连接 DNA 结合。核小体的大小以碱基对表示,即两个邻近的连接 DNA 中心的距离。

组蛋白从染色质或核中的提取是依据它们在稀酸中独特的溶解性(如在 0.25mol/L HCl 或 0.2mol/L H₂SO₄ 中的溶解)而进行的,在这样的酸性条件下几乎没有其它可溶性蛋白存在,尤其是在鸡红细胞中。

二、试剂

取鸡血时注意容器中要预先放入冷的 SSC 缓冲液防止血凝。

SSC 缓冲液:0.15mol/L NaCl, 15mmol/L 柠檬酸钠缓冲液。

红细胞裂解缓冲液:含 10mmol/L NaCl、5mmol/L MgCl₂、0.5% Triton X-100 的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.4。

网织红细胞标准缓冲液:含 1mmol/L CaCl₂、10mmol/L NaCl 的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.4。

微球菌核酸酶:用蒸馏水配成 150 单位/μl,分装成 5μl 的小

包装并冷冻贮存待用。

蛋白酶 K: 用蒸馏水配成 25mg/ml, 冷冻贮存

酚溶液: 新鲜配制的饱和酚溶液, 加入 8-羟基喹啉使之终浓度为 0.1% (W/V)。

Tris-硼酸-EDTA 缓冲液: 含 89mmol/L 硼酸, 89mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA。

电泳样品缓冲液(用于 DNA): 内含 0.04% 溴酚蓝、0.04% 二甲苯氰 FF、5% 甘油的 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液。

溴化乙锭: 用水配成 10mg/ml, 暗中贮存。

标准 DNA: 用 Hpa I 消化的 pBR322 质粒, 或用 Msp I 消化的 pBR322 质粒, 用样品缓冲液配成 1 μ g/ μ l。

三、操作方法

1. 鸡红细胞核的分离

新鲜鸡血用等体积的冷 SSC 缓冲液混匀, 以下程序在 4 $^{\circ}$ C 进行操作。用 500 \times g 离心 10 分钟获得红细胞沉淀, 沉淀用 SSC 缓冲液洗两次, 获得的红细胞用 4 倍体积的裂解缓冲液悬浮并搅拌 90 分钟, 核即可释放出来, 在 1000 \times g 条件下离心 10 分钟可得核沉淀, 同样再用该缓冲液洗几次, 直到上清液清亮透明为止, 此时获得的核可用于进一步分析, 也可用裂解缓冲液加 66% (V/V) 甘油悬浮成大约 4 \times 10⁹ 个/ml 的浓度于 -20 $^{\circ}$ C 贮存数月。

2. 核蛋白成分分析:

取 50 μ l 核悬浮液转移到 0.5ml 的 Eppendorf 管中, 在小离心机上高速离心 (10000r/min) 2 分钟收集核, 弃去上清后加 200 μ l 的 SDS 样品液, 振荡、悬浮核。从核中释放出来的 DNA 形成的粘胶样物质, 将其沸水浴保持 3 分钟, 再在离心机上高速离心 10 分钟, 收集沉淀, 此样品即为核“总蛋白”样。

3. 组蛋白的分离:

将 50 μ l 核悬浮液转移到 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 用 1ml 的

网织细胞标准缓冲液(RSB液)稀释,如2步离心收集核,弃去上清后用0.25mol/L HCl 50 μ l再悬浮并振荡混匀,室温放置1小时,再离心收集上清。另向沉淀中加50 μ l 0.25mol/L HCl,重复前一步骤,合并两次离心的上清后加8倍体积冷丙酮用于沉淀组蛋白,-20 $^{\circ}$ C放置过夜。第二天离心收集组蛋白沉淀,并用丙酮洗三次后风干,沉淀用200 μ l SDS样品液溶解,然后同2步一样进行沸水浴,离心操作。所得样品为“组蛋白”样。

4. 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析上述获得的两个样品,浓缩胶浓度为7.5%,分离胶浓度为15%,详细操作步骤可见实验28。

5. 用微球菌核酸酶消化分离的核:

取50 μ l核转移到1.5ml的Eppendorf管中,并用1ml RSB缓冲液悬浮,同步骤2中离心2分钟,取沉淀,弃上清后再悬浮于1ml RSB缓冲液中;取一份5 μ l的微球菌核酸酶用55 μ l RSB缓冲液稀释,其终浓度为1.25单位/ μ l。向盛有样品的Eppendorf管中加入2~16 μ l的核酸酶液于37 $^{\circ}$ C保温,反应开始时开始计时,0分钟作为对照,然后分别于5,10,15,20,25,30分钟分别取出300 μ l反应液转移到一个预加了30 μ l的冷100mmol/L EDTA的试管中,以终止反应,最后再加入33 μ l 10% SDS和1.5 μ l蛋白酶K于各Eppendorf管中,并于37 $^{\circ}$ C保温30分钟,完毕后加入等体积的酚溶液,振荡混匀,再离心5分钟进行分离,将水相(上层)转移到新的Eppendorf管中,并加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1, V/V),重复抽提。

将水层转移到新的Eppendorf管中,加入6 μ l 5mol/L NaCl和2倍体积的冷乙醇,-20 $^{\circ}$ C保存30分钟,高速离心15分钟后收集DNA沉淀,再用0.5ml 70%乙醇洗涤沉淀,同上弃去上清,风干沉淀,最后用电泳样品缓冲液10~20 μ l溶解待用。

用Tris-硼酸-EDTA缓冲液配制1.8%的琼脂糖凝胶,板块大小可选15 \times 11cm,其余步骤可参见实验6。电泳条件为100V,

直到染料到达胶端 1 厘米处。标准 DNA 可用于核小体 DNA 分子大小的参照。

核小体 DNA 的大小可以通过作图法计算,首先量出每条带(中心位置)的迁移距离,标准大小的 DNA 参照用于其大小的对数值对迁移距离作图。

实验五十三 核苷酸的电泳分离鉴定

I. 纸电泳法分离核苷酸

一、原理

带电荷的物质在电场中向阳极或阴极移动的现象称为电泳。

核苷酸上有各种可解离基团,妥善控制条件,因各种不同的成分带上不同的净电荷,使其在电场中移动的速度不一样,从而达到分离的目的。就核苷酸而言,其上可解离基团有磷酸基,碱基环的 N 杂原子和烯醇基,其中各核苷酸的磷酸基解离(一级和二级解离)差异不大;且尿苷酸和鸟苷酸上的烯醇基解离差异也不大,而胞苷酸和腺苷酸又无此基团,所以最有价值的是各核苷酸上的 N 杂原子的解离差异(见下表)。

四种核苷酸在 pH3.5 时离子化程度与净负电荷

核苷酸名称	碱基解离的 pKa 值	离子化程度	净负电荷
UMP	—	—	-1.00
GMP	2.30	0.06	-0.94
AMP	3.56	0.54	-0.46
CMP	4.28	0.89	-0.11

从表中可以看出,各核苷酸在 pH3.5 时,氨基解离差异最大,故 pH3.5 是最适电泳 pH 条件。此时各核苷酸的磷酸基一级解离已

完全(带一个负电荷),而二级解离尚未进行。

用滤纸作为支持物的电泳称为纸电泳分析法。

二、试剂

柠檬酸缓冲液(pH3.5):取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)16.2g,柠檬酸三钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)6.7g用蒸馏水溶解,定容到2000ml。

标准核苷酸液(AMP、GMP、CMP、UMP)用水配成5mg/ml。

未知成分的核苷酸混和液、滤纸、电泳配套装置。

三、操作方法

准备好电泳槽,向二边槽内加入柠檬酸缓冲液(pH3.5),使两边等高。

取滤纸 30×10 cm,在距纸一端10cm处用铅笔轻划一基线,从基点中间开始向左右两侧间隔1.5cm作一记号,共5点,用于点样。用毛细管将各标准液AMP、GMP、CMP、UMP和未知的混和液分别点于滤纸的各记号处,每样点2~3次,注意斑点直径勿超过2mm。用吹风机吹干。

电泳:用喷雾器将电泳缓冲液(pH3.5)均匀地喷于纸上(点样处最后喷),然后将滤纸平整地放在电泳槽的滤纸架上,纸二端垂入电极缓冲液中,盖上盖子平衡5分钟,接上电极,点样端在负极,接通电源,调整电压在300V,室温通电2小时。电泳毕后,关闭电源取出滤纸,将其烘干(或电吹风或 $80 \sim 50^\circ C$ 烘箱)。

将烘干的滤纸于紫外灯下观察,用铅笔将各斑点划出。比较标准品与待测品,确定混合液中为哪种核苷酸。

将电泳结果画在实验报告本上。

II. 琼脂糖凝胶电泳分离核苷酸

此法的分离原理与纸电泳原理相同。

本法的分离效果更好,且电泳时间短。如 AMP、ADP、ATP 的分离只需 10 分钟;分离腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶以及它们的核苷、核苷一磷酸、核苷二磷酸和核苷三磷酸只需 15 分钟。

一、试剂

0.05mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.1)、琼脂糖、标准核苷酸溶液(AMP、GMP、CMP、UMP)(用水配成 10mg/ml)。

二、操作方法

取 0.4g 琼脂糖用 50ml 水溶解,另取 50ml 的 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液(pH3.1),加热到 60°C,立即与前者混匀,取其 15ml 平铺于电泳板上(9×10cm),使琼脂糖凝结。

在电泳槽中倒入 pH3.1 的柠檬酸缓冲液,使两边的液面同高,然后将铺好胶的电泳板放入槽内,用滤纸桥将凝胶板与缓冲液相连。

取新华层析滤纸(4[#])剪成 1.5×8mm 大小共 5 张,然后取每种标准核苷酸及待测样 10μl 点到相应的纸片上,再将此滤纸片逐个按序嵌入到琼脂糖凝胶上(距一端 8mm),滤纸条之间的距离为 1.5cm 左右,同时距一端均为 8mm,排成一排。

接通电源,负极靠滤纸条一端,调电压为 300V,电泳 10 分钟,关闭电源,取出凝胶板于紫外灯下观察。用记号笔在背面作上记号,比较各样之间的电泳情况。

将结果画在报告本上。

Ⅲ. 醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸

其分离原理同低电泳分离核苷酸一样。

一、试剂

0.02mol/L 柠檬酸缓冲液(pH3.5)、醋酸纤维素薄膜。

二、操作方法

有关醋酸纤维素薄膜的处理参见血清蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳分离法。

同样采用水平式电泳槽进行电泳,其操作与纸电泳(I)相似。

醋酸纤维素薄膜裁成 $2\times 8\text{cm}$,先浸泡,然后凉干,于粗糙面点样(距一端1.5cm),斑点直径 $2\sim 3\text{mm}$,然后置于电泳槽上,以滤纸作电桥,平衡10分钟,电泳条件为电压 10V/cm 长(总 $100\sim 150\text{V}$),电流 $0.4\sim 0.6\text{mA/cm}$ 宽,电泳1小时。毕后,于紫外灯下鉴定电泳结果。

实验五十四 小牛胸腺 DNA 的提取

一、原理

小牛胸腺和鱼类精子含有较多的 DNA,是提取 DNA 的良好材料。

动植物的 DNA 是以核蛋白的形式存在于生物中(主要在核内),而 DNA 核蛋白(DNP)在 0.14mol/L NaCl 溶液中溶解度很低,仅是它在纯水中的 1%,而在 1mol/L NaCl 溶液中,其溶解度至少是纯水中的二倍。相反,核糖核蛋白(RNP)能在 0.14mol/L NaCl 溶液中溶解。利用这一性质,可使脱氧核糖核蛋白与核糖核蛋白分开,当核蛋白与氯仿一起振荡或在氯仿中透析时,蛋白质变性而与核酸分开,核酸继续保留于水相中,可用乙醇使其析出。

二、试剂

新鲜小牛胸腺;

CS 缓冲液:2.94 克柠檬酸钠和 9.0 克 NaCl 溶于 1 升水,调 pH 至 7.0;

0.1mol/L EDTA:37.2 克 EDTA 二钠盐溶于 1 升水中;

1.0mmol/L EDTA:10ml 0.1mol/L EDTA 溶液稀释至 1 升;

0.15mmol/L 柠檬酸钠溶液(pH7.0):称取 44.1 克柠檬酸钠,溶解加入 4mol/L HCl 调 pH 至 7.0,然后定容至 1 升;

20%SDS:40.0g SDS 缓慢溶解于 200ml 水中;

氯仿-异戊醇(24:1);

0.4mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0):称 54.8 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot$

H₂O 溶于 800ml 水中,用 6mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,定容至 1 升;

0.1mol/L 磷酸钠-1.0mmol/L-EDTA (pH7.0): 取 250ml 0.4mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)加入 10ml 0.1mol/L 的 EDTA 溶液,调 pH 至 7.0 稀释至 1 升。

三、操作方法

1. 称取 15 克小牛胸腺,剔除脂肪,剪碎加 50ml CS 缓冲液,高速匀浆 5 分钟。

2. 匀浆液倒入离心管中,以 6500rpm 离心 15 分钟。

3. 去除表面脂层和上清液,将沉淀物置于匀浆器中,加 50ml CS 缓冲液,匀浆。

4. 重复步骤 2 和 3,将沉淀物悬浮于 90ml pH7.0 柠檬酸钠溶液中,转移到烧杯中,加 8ml 20% SDS 溶液,要缓慢加入,约 15 分钟,用磁力搅拌器继续搅拌 5 分钟,可见悬浮液粘度增大,然后在 55°C 水浴中保温 15 分钟,并不断搅拌。再于此时加入 8 克 NaCl 固体,继续搅拌 10 分钟直至盐全部溶解。

5. 冷却后转移到 250ml 的分液漏斗或具塞三角瓶中,加 100ml 氯仿-异戊醇(24:1)溶液,彻底摇匀。

6. 将上述溶液以 10000r/min 离心 15 分钟,弃去中间的白色凝胶物和氯仿层,保留上清层并缓缓加入二倍体积的预冷乙醇(95%),边加边搅,用玻棒缠绕 DNA 纤维,挤干,用 95%乙醇洗两次,后用分析纯丙酮清洗,直至洗出液不混浊,将 DNA 从玻棒上剥下,于干燥器中过夜干燥,称重可得出粗回收率。再以 SC 缓冲液溶解,用定量法测定其 DNA 含量,可计算出净得率和产物纯度。

实验五十五 植物 DNA 的提取

一、原理

本法是植物总 DNA 的提取方法。先将新鲜的叶片在液氮中研磨以机械力破碎细胞壁,然后加入 SDS 使细胞膜破裂,并同时使蛋白质和多糖等杂质与核酸分开。加入 KAc 可使 SDS-蛋白质复合物转变为溶解度更小的钾盐形式,使沉淀更加完全。

二、试剂

DNA 提取缓冲液:100mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 50mmol/L EDTA pH8.0; 500mmol/L NaCl; 10mmol/L α -巯基乙醇。

Tris/EDTA 缓冲液; 50mmol/L Tris-HCl pH8.0; 10mmol/L EDTA, pH8.0。

10%SDS 溶液; 5mol/L KAc; 3mol/L NaAc; 异丙醇; 乙醇。

三、操作方法

1. 取 1 克幼叶组织,用液氮研磨至粉末。
2. 将粉末转入一个 50ml 离心管中,加 15ml DNA 抽提缓冲液,用玻棒或倒管混和均匀。
3. 加入 2ml 10%SDS,激烈摇动离心管以混和均匀,然后在 65°C 水浴中保温 12 分钟,并间或倒管。此步因 SDS 于解冻提取物中易沉淀,故 65°C 有利于 SDS 彻底溶解并与提取物充分混匀。
4. 加入 5ml 5mol/L KAc,颠倒管以充分混匀,冰浴放置 30 分钟。

5. 4°C, 12000rpm 离心 30 分钟, 去上相转入一洁净离心管, 加入 15ml 异丙醇(预冷至-20°C), 仔细混匀后并于-20°C 沉淀 30 分钟。

6. 4°C, 8000rpm 离心 20 分钟, 去上相, 将沉淀物吹干或抽真空(只需部分干燥)。

7. 温和地将沉淀物溶于 700 μ l TE 缓冲液中, 并将其转入一 Eppendorf 管中, 15000rpm 离心 5 分钟去除污染物。

8. 转移上相至另一 Eppendorf 管中, 加入 75 μ l 3mol/L NaAc (pH5.2), 加 500 μ l 预冷至-20°C 的异丙醇, 充分混匀, 出现丝状核酸沉淀物, 如果未形成沉淀, 则置冰上 10 分钟。

9. 15000rpm 离心 30 秒, 小心弃上相。

10. 用 80%乙醇冲洗沉淀两次, 真空抽干或吹干, 于 80 μ l 无菌重蒸水中溶解。沉淀应是白色、紧密的丝状物, 最后将 DNA 于 4°C 下再溶解 1~2 小时, 确保 DNA 充分溶解。

11. 电泳鉴定 DNA 浓度。

四、说明

本法适于许多禾谷类 DNA 的提取, DNA 产率可达 40~120 μ g/g 鲜重幼叶。

最终的 DNA 制品溶液可用于限制性内切酶消化(7~10 μ l), Southern 杂交分析等。酶切消化时需加大酶量并反应 3~4 小时。

实验五十六 从细菌细胞中提取 DNA

一、原理

染色体 DNA 很脆弱,分子量很大,要得到一完整、毫无损伤的形式很难。目前虽有不少分离方法可以得到有活性的 DNA,但不意味着它毫无损伤。这些方法的产物仍然是具高分子量的稳定形式,且 RNA 和蛋白质污染程度低,本实验中就是介绍这样一个对大多数微生物都适用的方法。

在实验中影响 DNA 结构的因素主要有以下几个;pH 值、温度、离子强度、细胞自身因素和机械作用。一般的分离过程可以分这样三步,

1. 破细胞壁

破细胞膜将 DNA 释放到一个合适的介质中去,保证 DNA 的可溶性和防止 DNA 被降解。

破细胞壁常用溶菌酶完成,它能催化胞壁糖分的糖苷键断裂,引起外膜破裂释放出 DNA 和其它细胞成分;溶解 DNA 的介质是一个含 EDTA 的钠盐溶液。EDTA 有两个作用,一是可结合与 DNA 中的磷酸根成盐的一些二价金属离子(如 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+}),二是抑制脱氧核糖核酸酶,因为这些酶需 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ,柠檬酸也偶尔用作 DNA 提取过程中的整合剂,不过它结合 Mn^{2+} 的效果不好。而弱碱性环境(pH8)能减弱 DNA 与组蛋白,多胺之间的电荷作用力,当然相对高的 pH 也能降低核酸酶活力和使蛋白质变性。

2. 蛋白质-DNA 复合物的解离

去污剂常被采用以破坏带正电荷的组蛋白与带负电荷的 DNA 骨架间的离子作用,如阴离子去污剂 SDS,能与蛋白质结合并使它们带上大量的负电荷,同时 SDS 也能使脱氧核糖核酸酶和其它蛋白质变性。有利于蛋白质-DNA 复合物解离的是高 pH,它能减少组蛋白的正电荷性质。高浓度的盐(如 NaCl 或高氯酸钠)也利于这样的解离和消除带正电荷的胺类,减小了 DNA 与阳离子之间的离子作用。

3. DNA 与其它可溶性细胞成分的分离

在沉淀 DNA 之前,要先去蛋白。经过氯仿/异戊醇的处理后离心即可达此目的,离心后溶液可见三层:上层为水相,下层为有机相,二者之间存在有变性蛋白带,其中氯仿促使蛋白质变性,异戊醇则起消除泡沫和稳定二相的界面之作用。

含核酸的上层水相在加入乙醇后 DNA 就会沉淀出来,这是环境介电常数变化引起,但此 DNA 中仍会有 RNA 和蛋白质的污染,蛋白质的进一步去除可重复上述操作。RNA 的去除可采用去蛋白后进行核糖核酸酶消化,再经异丙醇沉淀,RNA 就会在溶液中出现。经过多步的去蛋白质和乙醇沉淀可获得较高纯度的 DNA。

本法大约有 50% 的细胞 DNA 可获得,平均每克湿细胞得 1~2mgDNA,所得 DNA 的分子量为 10×10^6 。

DNA 的纯度可用许多方法进行确定,其中较方便的如紫外光吸收法,根据 DNA 的结构特点,它在 260nm 有最大吸收峰,而蛋白质的吸收峰主要在 280nm,通过 A_{260}/A_{280} 比值可以确定 DNA 样品中核酸与蛋白质的份量。分离的 DNA A_{260}/A_{280} 的典型值为 1.9,比值越低,蛋白质污染越厉害。

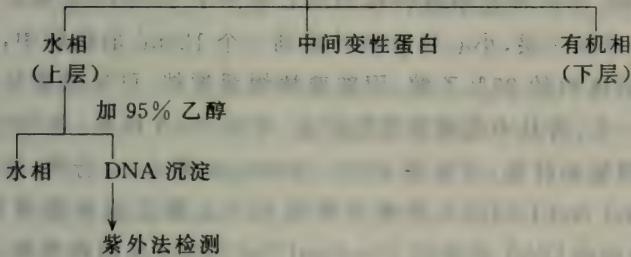
下面是分离 DNA 的流程图:

二、材料和试剂

细菌细胞,湿包装用 2~3g,干粉样用 0.5g,建议使用 *Bacillus subtilis*,或 *Escherichia coli*,或 *Clostridium welchii*。

细菌细胞

1. 用 NaCl/EDTA 悬浮
2. 加溶菌酶温育
3. 加 25% SDS, 热处理
4. 加高氯酸钠
5. 加氯仿 / 异戊醇
6. 10000 × g 离心



NaCl-EDTA 溶液: 0.15mol/L NaCl 加 0.1mol/L EDTA, pH8;

SDS, 25% 溶于水;

10mg/ml 溶菌酶溶液, 用水配制;

5mol/L 高氯酸钠;

氯仿: 异戊醇 (24 : 1);

95% 乙醇;

NaCl-柠檬酸溶液: 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸, pH7.0;

离心机, 紫外分光光度计, 水浴槽, 磁力搅拌器。

三、操作方法

1. DNA 的分离

取适量菌体(湿 2~3g, 干粉 0.5g)用 25ml NaCl-EDTA 溶液溶于 125ml 容量瓶中, 加 1ml 溶菌酶溶液(10mg 该酶), 混匀后于 37°C 温育 30~45 分钟, 加 2ml 25% SDS 溶液使细胞彻底裂解, 再混匀于 60°C 加热 10 分钟, 轻缓搅拌以避免产生过多泡沫, 溶液粘度增加, 透明度下降表明核酸已从裂解细胞中释放出来。

将加热过的混合物用冷水冲冷至室温, 加 9.0ml 5mol/L 高氯酸钠使其终浓度为 1mol/L, 轻轻混匀, 再加与其相等体积(约 40~45ml)的氯仿: 异戊醇(24: 1)溶液, 置于分液漏斗中振荡 20~30 分钟, 而后将此溶液转移到离心管中于 $10000 \times g$ 离心 5 分钟, 结果可见三层, 小心将水相转移到一个 125ml 的烧杯中, 小心加入 2 倍体积的 95% 乙醇, 用玻璃棒缓缓搅拌, 可见核酸纤维缠于玻棒一头, 将其中的溶剂轻轻挤出, 可得 DNA 样品。若 DNA 未能形成明显的纤维, 可采用 2000~3000rpm 离心 10 分钟, 将沉淀溶于 10ml NaCl-EDTA 溶液后再用 95% 乙醇沉淀来获得 DNA 样品。最后将 DNA 纤维用 10~15ml NaCl-EDTA 溶液溶解, 保存此溶液用于分析鉴定。

若需要, 此 DNA 样品可用氯仿/异戊醇再处理以更彻底去蛋白。

2. 分离 DNA 的紫外测定

取上述(1步)的 DNA 样品液 0.5ml 用 4.5ml NaCl-柠檬酸溶液稀释, 以 NaCl-柠檬酸液作空白测定其 A_{260} 。若该值大于 1.0, 则需进一步稀释, 使 A_{260} 最好落在 0.5~1.0 之间, 同样测定其 A_{280} 。

四、结果

1. 作好记录, 分析各步骤中所有试剂的作用, 估计对 DNA 分子结构产生的破坏作用。

2. 计算 A_{260}/A_{280} , 说明你分离的 DNA 样品中含有多大比例的蛋白质。若 DNA 的 $E_{260}^{1\%}$ 为 200, 计算 NaCl-柠檬酸溶液中 DNA

的浓度($\mu\text{g/ml}$),并说明 DNA 的总产量。

五、思考题

- 1. 在溶菌酶-SDS 处理时为何溶液粘度增加?
- 2. 如何从核酸制品中分离 RNA?
- 3. 若一纯化的 DNA 溶液的 $A_{260}=0.55$ (光径为 1cm),计算 DNA 的浓度($\mu\text{g/ml}$)?

实验五十七 DNA 的 T_m 值测定

一、原理

天然 DNA 溶液在 240~310nm 的紫外区具有很强的光吸收, 其中最大光吸收波长在 260nm, 这主要是 DNA 中的嘌呤和嘧啶碱基所致。当 DNA 溶液用变性试剂(如热、碱、有机溶剂)处理时其紫外吸收特性发生剧烈改变。如加热对 DNA 紫外吸收的影响可以通过 $A_{260(T)}/A_{260(25^{\circ}\text{C})}$ 对温度作图所得的曲线中看出, 此曲线称为热变性曲线或溶解曲线(可参看有关教材), 光吸收变化的中点对应的温度定义为 T_m , 即变相温度或溶解温度。每个物种的 DNA 都有其特定的 T_m 值可用于鉴定、分析。

光吸收的增加即增色效应是因为 DNA 有序的双螺旋结构转变成了无序的、不配对的 DNA 变性结构。DNA 双螺旋结构的维持有赖于互补链之间的氢键、堆积碱基间的疏水相互作用和 $\pi-\pi$ 作用, 所有破坏这些作用的因素都会导致双螺旋的解链, 在这种随机卷曲的状态下, 碱基相互作用减小, 芳香环的共振发生变化, 因此引起了光吸收的增加。

T_m 的测定与变性条件的研究可为我们提供有关 DNA 核苷酸组成的有意义信息, 同时也有助于判断 DNA 的纯度与数量。

二、试剂

DNA: 直接购买或自己制备均可。用标准 NaCl-柠檬酸缓冲液配制成 $20\mu\text{g}/\text{ml}$, $A_{260}=0.4$, 若进行操作了, 使其 $A_{260}=0.8$;

标准 NaCl-柠檬酸: $0.15\text{mol}/\text{L}$ NaCl, $0.015\text{mol}/\text{L}$ 柠檬酸钠,

pH7.0;

恒温循环装置,以乙二醇作介质(操作 1);

紫外分光光度计和石英比色杯;

不同温度恒温槽,35、50、70、75、80、85、90、95、100°C(操作 2);

NaCl-柠檬酸的二甲基甲酰胺溶液;

① 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠, pH7.0, 溶于 20%DMF;

② 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠, pH7.0, 溶于 40%DMF;

③ 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸钠, pH7.0, 溶于 60%DMF。

三、操作方法

1. 用循环恒温装置测 T_m

按操作规程打开紫外分光光度计预热 20 分钟。设定循环恒温装置于 25°C,进行光吸收的初步测定。

若是自制 DNA,先于 25°C 测 A_{260} ,用标准 NaCl-柠檬酸溶液稀释至 $A_{260}=0.4$ 。并注意使其终体积适合于比色杯(或 1ml,或 3ml)。

以标准 NaCl-柠檬酸溶液于 260nm 下调整光吸收零点。

然后将装有待测的稀释 DNA 溶液的比色杯置于分光光度计的样品室中,平衡三分钟,测其 A_{260} 。

再将温度升高到 50°C,取出比色杯将其内壁的汽泡赶出。

继续升温到 80°C,平衡 5 分钟后测 A_{260} 。

现在按每次升高 2°C 的方式升温,然后平衡温度(约 5 分钟),记录 A_{260} 。按此方式一直进行到 A_{260} 不再升高为止。

你应该看到有一个 5~10°C 的温度范围,其 A_{260} 大幅度升高。

2. 用恒温水浴装测 T_m

最少设定 6 个恒温水浴装置(50、80、85、90、95、100℃),若条件许可,可以多设定几个,见材料和试剂部分的说明。

按操作规定预热紫外分光光度计 20 分钟。

DNA 溶液的浓度控制在 $A_{260}=0.4$ 。

取试管(最少 8 支),向其中各加入 3ml DNA 溶液,盖上帽子,温育 15 分钟。其中 1 支试管放室温,二支试管放 100℃,其余温度水浴各一支试管,温育完成后迅速冷却试管,但室温和 100℃ 一支不用这样处理,而是置于冰浴中放 10 分钟,另一支 100℃ 保温的试管则缓慢冷却到室温。

测定各管 DNA 溶液的 A_{260} ,而缓慢冷却的那支试管在室温下至少放置 1 小时再测 A_{260} 。

3. 二甲基甲酰胺对 DNA 变性的影响

本实验所采用的 DNA 溶液应控制在 $A_{260}=0.8\sim 0.9$ 。

准备 4 支试管按下表加各种试剂,然后将各管内的混合物于室温保持 15 分钟,测定各自的 A_{270} 。

试剂(ml)	-	1	2	3	4
DNA($A_{260}=0.8\sim 0.9$)		2.0	2.0	2.0	2.0
NaCl-DMF,0%		2.0	—	—	—
NaCl-DMF,20%		—	2.0	—	—
NaCl-DMF,40%		—	—	2.0	—
NaCl-DMF,60%		—	—	—	2.0

四、结果分析与思考题

1. 计算各温度下的 $\Lambda_{260(T)}:\Lambda_{260(25^{\circ}\text{C})}$,并以此比值对温度作图,连接各点成平滑曲线,估计出光吸收增加的中点,此即 T_m 。

在增色效应中的增加百分比是多少?它对你所使用的 DNA 样品纯度如何解释?

利用下式计算 DNA 样品中的 GC% 含量。

$$GC\% = 2.44(T_m - 69.3)$$

2. 就实验 2 来说, 比较两支在 100°C 水浴中保温的试管之 $A_{260(T)}/A_{260(25^{\circ}\text{C})}$ 的差异。二者为何不同? 根据 DNA 分子结构解释实验现象。

3. 以 A_{270} 为 y 轴对缓冲液中的 DMF 浓度作图, 解释曲线形状、DMF 对 DNA 结构有何影响?

4. 请预测并解释在下列各种情况下天然 DNA 的 T_m 值情况

① pH12 缓冲液中的 T_m 测量;

② 纯蒸馏水中的 T_m 测量;

③ 50% 甲醇-水中的 T_m 测量;

④ 含 SDS 的标准 NaCl-柠檬酸缓冲液中的 T_m 测量。

5. 有一高纯度 DNA 样品, 在 25°C 时其 $A_{260} = 0.45$, 将该样品分成两份进行下列处理:

样品 I

1. 加热到 100°C

$$A_{260(100^{\circ}\text{C})} = 0.65$$

2. 冰水迅速冷却

$$A_{260(25^{\circ}\text{C})} = 0.55$$

样品 II

1. 加热到 100°C

$$\text{其 } A_{260(100^{\circ}\text{C})} = 0.65$$

2. 非常缓慢地冷却到 25°C

$$A_{260(25^{\circ}\text{C})} = 0.46$$

请解释在 25°C 下为何会有不同的 A_{260} 值?

3. 有一 DNA 样品, 纯化学降解后测得其 AT 含量为 60%, 请估计其 T_m 值。

4. 一纯化的 DNA 样品在 37°C 用脱氧核糖核酸酶温育, 在 5 分钟内从该混合物中每隔一分钟取出一份混合液并测其 A_{260} , 数据如下:

时间(分钟)	A_{260}
0	0.60
1	0.64
2	0.67

3 0.70

4 0.72

5 0.73

请说明 DNase 对 DNA 的作用结果并解释 A_{260} 增加的现象。

5. 在操作 3 中为什么在 270nm 下测光吸收值,而不是在 260nm?

实验五十八 兔肝 RNA 的制备

一、原理

本实验介绍修改的酚抽提法提取 RNA 的简便方法,置于浓的酚、水、氯化钠溶液中的细胞经高速匀浆后再离心,酚、间甲酚的疏水作用以及与氢的键合迅速使细胞膜破裂并使蛋白质变性,离心后呈两相,上层为水相,其中含有水溶性 RNA,多糖和小分子极性物质,如核苷酸、氨基酸等,以及残留的变性蛋白质;下层为酚相,其中有变性蛋白质和 DNA;在酚相和水相之间有一层凝集的变性蛋白质。水相再用酚抽提一次以去除残留的变性蛋白,所得水相再用乙醇沉淀, RNA 和多糖以絮状沉淀出现,经离心可得粗 RNA 制品。该粗 RNA 制品继续用盐抽提 (3.0mol/L NaAc), rRNA 和 mRNA 这些大的多聚阴离子物质不溶于此盐溶液,而非离子型多糖和小的离子型分子,如 tRNA, 5sRNA 则溶解,然后离心可得 rRNA 和 mRNA 的混和样品。

二、试剂

苯酚-间甲酚溶液: 500g 苯酚, 70ml 间甲酚, 500ml 蒸馏水;

乙醇-间甲酚溶液: 间甲酚溶于 95% 乙醇, 使其浓度为 10%;

3.0mol/L 醋酸钠溶液、70% 乙醇、无水乙醇、干冰或液氮。

三、操作方法

杀死兔子, 迅速取出肝脏, 立刻用液氮或干冰冷冻后称重备用。

取 20g 肝切碎,加入 300ml(1:15(W/V))酚-间甲酚:水:1.0%NaCl 为 1:1:1 的盐酚试剂,用高速组织捣碎器匀浆,置室温下搅拌 10 分钟,再经 3000rpm 离心 20 分钟。

小心取出水相,计量体积,然后加入 NaCl 使其终浓度为 3g/100ml,再加 0.5 倍体积的盐酚试剂,室温下搅拌 5 分钟,以 3000rpm 离心 20 分钟。

小心取出水相并量出体积,加 2 倍体积的冷乙醇-间甲酚试剂,于冰浴中放置 30 分钟,使其充分凝集,经 3000rpm 离心 25 分钟,弃去上清,可得粗 RNA 沉淀。

以下步骤的容器和试剂均需预冷。

将粗 RNA 沉淀用 0.5ml 3.0mol/L NaAc 溶液溶解,用无菌干净玻棒搅开沉淀,再补加 10ml 3.0mol/L 醋酸钠液悬浮样品,然后转移到小离心管中,另用 1.5ml 的 3.0mol/L NaAc 液洗涤原来的容器后也一并转移到小离心管中,经 8000rpm 离心 15 分钟,弃上清,沉淀再重复一次 3.0mol/L NaAc 抽提,经 8000r/min 离心 20 分钟,所得沉淀再加 75%冷乙醇,经 12000rpm 离心 15 分钟,弃上清,沉淀再用 12ml 无水乙醇脱水,经 12000r/min 离心 15 分钟,弃上清。沉淀置干燥器内干燥 2 小时,可得 RNA 样品。

四、结果分析

样品干燥后,精确称重,与原始肝重比较计算产率。

所得样品可用几种方法进行鉴定,一是测定其吸收光谱;二是用地衣酚反应测定核糖含量;三是将样品用碱水解方法产生的核苷酸产物进行纸电泳鉴定;四是用 PAGE 或琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的大小。

实验五十九 大肠杆菌 ColEI 质粒的大量制备与纯化

质粒 DNA 是一种有用的克隆载体,存在于细菌细胞中,是一种共价闭合的环状 DNA,它们在空间结构上与寄主染色体不在一起。其存在通过生物素抗性的遗传特征来证实,在分子遗传学和基因工程的研究中常常要涉及到质粒 DNA 的分离,其目的不外乎以下几种情况:①构建新的重组质粒;②利用琼脂糖凝胶电泳分析其分子量;③限制性酶切消化的电泳分析;④建立限制性酶切图谱;⑤核苷酸序列分析;⑥杂交试验。

目前已建立了几种分离质粒 DNA 的方法,但产物纯度不一样,每种方法都会涉及三个基本步骤:细菌的培养和质粒的扩增,细菌的收集和裂解,质粒 DNA 的提取纯化。目的不同,所需质粒的纯度要求也不一样。

质粒 DNA 区别于染色体 DNA 的特征除了前面提到的质粒 DNA 是以共价闭合环状形式存在外,还有质粒 DNA 比染色体 DNA 要小得多,利用这样的结构差别,进行质粒 DNA 和染色体 DNA 的分离,其原理主要有这样三个范畴:

- a. 利用质粒 DNA 和一定固相之间的专一相互作用分离之,如硝酸纤维素膜和羟磷灰石的吸附。
- b. 利用各种试剂选择性沉淀染色体 DNA。而质粒 DNA 对极性 pH、温度或其它变性试剂具有一定的抗性。
- c. 当有染料插入 DNA 时,这两种类型的 DNA 的沉降行为明

显不同,此法可用高纯度质粒 DNA 的获得。

本实验中我们介绍煮沸法分离质粒 DNA 的方法以及超离心法的进一步纯化。其中的高温处理主要有两个目的,一是使染色体 DNA 发生不可逆变性,形成不溶凝胶,可进一步通过离心去除,二是使脱氧核糖核酸酶和其它蛋白质发生变性,而质粒 DNA 在加热处理时尽管有部分变性,但冷却后可重新形成双螺旋结构。

氯化铯-溴化乙锭平衡离心法分离质粒和染色体 DNA 取决于溴化乙锭与线状以及闭合环状 DNA 分子的结合量不同。溴化乙锭通过嵌入碱基之间而与 DNA 结合,进而使双螺旋解旋,闭环质粒 DNA 结合的溴化乙锭有限,而线状 DNA 则结合更多的溴化乙锭,直到饱和(约每 2 个碱基结合 1 分子溴化乙锭)。由于染料结合量不同,线状和闭环 DNA 分子在含有饱和量溴化乙锭的氯化铯梯度中浮力密度不同,最终得以纯化。其缺点是昂贵费时,且有溴化乙锭的潜在危险性,目前已有更好的替代方法。

I. 质粒 DNA 的分离

一、试剂

E. Coli 细胞;

标准 Tris 缓冲液:0.01mol/L Tris-HCl,含 0.1mol/L NaCl,0.1mmol/L EDTA,pH8.0,冷藏保存;

溶菌酶溶液(10mg/ml):用标准 Tris 缓冲液配制,新鲜配制;
本生灯、水浴槽、离心机。

二、操作方法

1. 将 100ml 培养物于 $4000\times g$ 离心(4°C)10 分钟,弃去上清。
2. 向该沉淀中加入含 NaCl 和 EDTA 的标准 Tris 缓冲液重新悬浮, $4000\times g$ 离心 10 分钟并弃去上清液。
3. 用 15ml 的标准 Tris 缓冲液悬浮沉淀,并转移到 50ml 容量

瓶内。

4. 加 2.0ml 溶菌酶溶液。

5. 用一个夹子把锥形瓶放在本生灯的明火上加热,直到液体恰好开始沸腾,不停地摇晃锥形瓶。

6. 立即把锥形瓶浸入到装有沸水的大烧杯中,将瓶放在沸水中,时间刚好为 40 秒。

7. 将瓶浸入冰水中使之冷却。

8. 将裂解液转移到离心管中, $12000 \times g$ 离心 (4°C) 20 分钟。

9. 将上清转移到另一试管内贮存,此溶液中含有质粒,可用于分析或进一步的超离心纯化。

II. 质粒的 CsCl 梯度超离心

一、试剂

含质粒的上清液、固体 CsCl;

Tris-EDTA 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl 含 1mmol/L EDTA, pH8.0;

溴化乙锭 (10mg/ml) (用水溶解)、轻石蜡油、异戊醇 (用水和固体 CsCl 饱和);

超离心机、皮下注射针头、透析袋。

二、操作方法

1. 测量从 I 获得的质粒 DNA 溶液的体积,按 1g/ml 的用量精确地加入固体 CsCl, 30°C 助溶,按每 ml CsCl-DNA 溶液加 0.6ml 溴化乙锭溶液。

2. 将混匀的溶液转移到超离心管中,离心管内剩余的空间用轻石蜡油补满,以 40000rpm 离心 40 小时。普通光照下在梯度中心可见两条 DNA 区带,上部区带材料通常较少,由线状的细菌 (染色体) DNA 和带切口的环状质粒 DNA 组成;下部区带由闭环

质粒 DNA 组成,管底深红色的沉淀是溴化乙锭-RNA 复合物,位于 CsCl 溶液和石蜡油之间的是蛋白质。

3. 离心后收集 DNA 带,用 18[#] 或 21[#] 皮下注射针头插入管内,针头斜面向上,位置刚好在下部红色带的下方,将质粒 DNA 区带收集到玻璃管或塑料管中。

4. 用异戊醇去除纯化的 DNA 中的溴化乙锭。将 DNA 溶液放入玻璃管或塑料管中,加等体积的异戊醇溶液(预先用水和固体 CsCl 平衡),振荡混匀两相,用台式离心机 2000×g 离心 5 分钟,将下层水相移至一干净管中。按此方法反复抽提 3 次以上,直到粉红色从水相和有机相中均消失。最后将水相转移到透析管中对标准 Tris-HCl/EDTA 缓冲液(pH8.0)透析 12~15 小时,中间每隔 4~5 小时换一次透析液,这步主要用于去除 DNA 溶液中的 CsCl。最后的质粒 DNA 溶液置于塑料管中贮藏待用。

Ⅲ. 用核糖核酸酶消化 DNA

一、试剂

I 中获得的 DNA 溶液;

RNaseA: 用 5mmol/L Tris-HCl(pH8.0)配成 1mg/ml,并于 80°C 水浴加热 10 分钟使 DNase 变性;

RNase T₁: 用 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 配成 500 单位/ml,同前处理使 DNase 变性;

10%十二烷基磺酸钠(SDS),用水溶解;

乙酸-MOPS 缓冲液: 0.1mol/L 醋酸、0.05mol/L MOPS, pH8.0;

异丙醇、乙醇;

Tris-EDTA: 0.01mol/L Tris-HCl、0.01mol/L EDTA, pH7.5。

二、操作方法

取 I 中获得的 DNA 溶液进行以下操作。

加 0.2ml RNase A 和 0.1ml RNase T₁, 混匀于 37°C 保温 15 分钟, 加 0.04ml 10% SDS 和 2ml 乙酸-MOPS 缓冲液 (pH8.0)。滴加 4ml 异丙醇沉淀质粒 DNA, 加异丙醇时要混和均匀, 室温下放置 15 分钟后, 于 6000rpm 离心 15 分钟。用 2ml 乙酸-MOPS 缓冲液溶解沉淀 (即质粒 DNA), 再加 2 倍体积乙醇沉淀质粒 DNA, 于 6000rpm 离心 15 分钟, 最后用 2ml Tris-HCl/EDTA 缓冲液 (pH7.5) 溶解沉淀。

IV. 结果分析

(I) 质粒 DNA 的分离: 画出分离步骤的流程图, 并简明解释每种试剂和每一步骤的用途。

(II) 质粒的 CsCl 梯度超离心: 画出离心后的离心管示意图, 指出管内每个区带中的成分。

附一 碱裂解法大量制备质粒

一、原理

用溶菌酶处理破坏菌体细胞壁后,再在高 pH 条件下(pH12~12.5)用 SDS 处理,染色体 DNA 发生不可逆变性,分子量较小的质粒 DNA 则具有抗性,加入高浓度酸性乙酸钾-乙酸缓冲液中和碱性溶液后变性染色体 DNA 凝聚成不溶性块状物,SDS 与蛋白质形成复合物在高盐浓度下也沉淀下来,且十二烷基磺酸钾的溶解度更小。而质粒 DNA 则留在水相中。此方法对于目前使用的所有大肠杆菌菌株都适合,并可与随后的纯化步骤,如聚乙二醇沉淀或氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心等一并联合使用。

二、材料与试剂

大肠杆菌。

溶液 I:葡萄糖-Tris-HCl-EDTA 溶液(GET)

50mmol/L 葡萄糖

25mmol/L Tris-HCl(pH8.0)

10mmol/L EDTA(pH8.0) 经 10lbf/in²

(6.895×10⁴Pa)高压下蒸气灭菌 15 分钟,4℃ 贮存。

溶菌酶溶液:10mg/ml,溶于 10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)。

溶液 II:0.2mol/L NaOH(临用前用 10mol/L 贮存液稀释)

1%SDS

溶液 III:

5mol/L 乙酸钾 60ml

冰乙酸 11.5ml

水 28.5ml

此溶液中钾浓度为 3mol/L, 乙酸根是 5mol/L。

TE(pH8.0)缓冲液:

10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)

1mmol/L EDTA(pH8.0)

三、操作方法

将洗过的 500ml 培养物的细菌沉淀物悬浮于 10ml 溶液 I 中, 加 1ml 新配制的溶菌酶溶液, 加 20ml 新配制的溶液 II, 盖紧瓶盖, 缓缓颠倒离心瓶数次, 以充分混匀, 于室温放置 5~10 分钟后, 加 15ml 用冰预冷的溶液 III, 封住瓶口, 摇动离心瓶数次以混匀内容物, 此时应不再出现分明的两个液相。

用 Sorvall GS3 转头(或与其相当转头)于 4°C 以 4000rpm 离心 15 分钟, 用 4 层干酪包布把上清过滤至 250ml 离心瓶中, 加 0.6 倍体积的异丙醇, 充分混匀, 于室温放置 10 分钟。

用 Sorvall GS3 转头于室温以 5000r/min 离心 15 分钟, 回收核酸。小心倒掉上清, 敞开瓶口, 倒置离心瓶使残余上清液流尽, 于室温用 70% 乙醇洗涤沉淀和管壁。倒出乙醇, 用真空干燥装置除尽乙醇。

用 3ml TE(pH8.0)缓冲液溶解核酸沉淀。此质粒 DNA 可用 RNase(1 μ g)进一步去除 RNA 杂质, 也可用氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心或聚乙二醇沉淀作质粒 DNA 的进一步纯化。

附二 SDS 裂解法大量制备质粒 DNA

一、说明

本法适合于大质粒(大于 15kb)的提取,但其产量要低得多。

二、材料及试剂

蔗糖-Tris 溶液:10%蔗糖

50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)

溶菌酶溶液:10mg/ml,用 10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)配制。

0.25mol/L EDTA 溶液(pH8.0)。

10%SDS、5mol/L NaCl、酚:氯仿、氯仿、TE 缓冲液(pH8.0)、乙醇。

三、操作方法

1. 将来自 500ml 培养物的细菌沉淀物洗过后悬浮于 10ml 用冰预冷的蔗糖-Tris 溶液中,然后转移到 30ml 带盖螺口塑料试管中。

2. 加 2ml 新配制的溶菌酶溶液,加 8ml 0.25mol/L EDTA (pH8.0),将管倒置数次以混匀悬液,在冰上放置 10 分钟。

3. 加 4ml 10% SDS,立即用玻棒迅速混匀内容物,使 SDS 均匀分散到整个细菌悬液中,操作应温和小心。

4. 立即加入 6ml 5mol/L NaCl(终浓度为 1mol/L),再次用玻棒温和而彻底地混匀内容物,在冰上放置至少 1 小时。

5. 于 4°C 用 Beckman Ti50 型转头(或与其相当的转头)以 30000rpm 离心 30 分钟,去掉高分子量 DNA 和细菌碎片。小心将上清转移到一个 50ml 的塑料离心管中,弃去沉淀物。

6. 上清液用酚:氯仿和氯仿各抽提一次。

7. 将水相转移到一 250ml 离心瓶中,于室温加入 2 倍体积的(约 60ml)乙醇,充分混匀,室温放置 1~2 小时。于 4°C 下以 5000 × g 离心 20 分钟,回收核酸。

8. 弃上清,于室温用 70%乙醇洗涤沉淀物。5000 × g 离心 20 分钟,去除乙醇,将离心管倒置于纸巾上使最后残存的乙醇流干。在真空干燥器中短时间干燥沉淀物,但不要使之完全干燥。

9. 用 3ml TE(pH8.0)溶解 DNA,它可以通过氯化铯-溴化乙锭梯度平衡作进一步的纯化。

实验六十 限制性内切酶对质粒 DNA 的消化

一、原理

限制性内切酶催化双链 DNA 特定的磷酸二酯键断裂。根据限制性内切酶的识别位点和核酸断裂性质大致可以将其划分为三种类型, I 型能识别双股 DNA 上的一个部位,而在另一随机部位单链裂解 DNA; II 型能识别 DNA 上的一特异序列,并在该序列中双股裂解 DNA; III 型是在距靶子序列的一端的一定距离上在两股 DNA 链上造成断裂。其中以 II 型最用价值,就一定的 DNA 来说,不同的限制性内切酶作用后会产生不同长度和不同序列的 DNA 片段。经限制性内切酶消化后的 DNA 可以产生不同的末端,即粘性末端或平齐末端,其中粘性末端又有 5' 粘末端和 3' 粘末端之分。如 EcoRI 消化后产生 5' 粘末端:
$$\begin{array}{l} 5' - G^{3'} \\ 3' - C - T - T - A - A^{5'} \end{array}$$
 用 HpaI 消化产生平齐末端,这些有关的数据可参考有关的书籍。

限制性内切酶是一类非常昂贵的试剂,使用过程中要仔细利用并有严格的计划。每种限制性内切酶都有特定的反应条件,如特别的 pH 范围,缓冲液组分,温育温度等,具体的使用也可参考有关的工具书或文献或产品说明。一般地温度 37°C, pH 7.5~8.0 对大多数酶来讲是适合的,但缓冲液的组分则变化很大,典型的组分应有 Tris、NaCl、MgCl₂ 和巯基试剂(如巯基乙醇或二硫苏糖醇)。

典型的反应体系中包括 1μg 或更少的 DNA 和 1 单位酶以及

合适的反应介质。其单位定义为在最适的温度和 pH 下在 1 小时内降解 $1\mu\text{g}\lambda$ 噬菌体 DNA 所需要的酶量。反应总体积通常控制在 20 和 $50\mu\text{l}$ 之间,反应时间在 1 小时,而反应的终止则由 EDTA 溶液的加入完成,因为它能螯合核酸酶活性所必需的金属离子。

消化的反应液可以通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

本实验是了解限制性内切酶对细菌质粒、 λ 噬菌体 DNA 或病毒 DNA 的作用情况。

二、试剂

1. 限制性内切酶的消化

DNA: 质粒、 λ 噬菌体或腺病毒 2, 用 Tris-HCl/NaCl/EDTA (pH7.0) 配成 0.5mg/ml 。

限制性内切酶: 1 单位/ μl , 冰冻保存备用。若以质粒 (pBR322 或 ColE1) 为对象, 建议使用 EcoRI 和 TaqI 两种; 若以 λ 噬菌体为对象则用 BamHI 和 EcoRI; 若以腺病毒 2DNA 为对象, 用 HpaI。

无菌水。

反应缓冲液:

BamHI: 0.2mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.07mol/L MgCl_2 , 1mol/L NaCl, 0.01mol/L 巯基乙醇。

EcoRI: 0.1mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1mol/L MgCl_2 , 1mol/L NaCl, 0.01mol/L 巯基乙醇。

HpaI: 0.1mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1mol/L MgCl_2 , 0.5mol/L NaCl, 0.01mol/L 巯基乙醇。

终止反应液: 0.1mol/L EDTA, pH7。

电泳样品溶解液: Tris-乙酸缓冲液, 内含 50% 甘油和 0.25% 溴酚蓝。

2. 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖。

琼脂糖悬浮液: 0.04mol/L Tris-乙酸, 2mmol/L EDTA,

pH7.8。

溴化乙锭:10mg/ml,溶于水。

电泳缓冲液:0.04mol/L Tris-乙酸,2mmol/L EDTA,
pH7.8,含0.5 μ g/ml 溴化乙锭。

三、操作方法

1. 限制性内切酶的消化

1) BamHI

取一支小试管按下列配方准备反应体系:

15 μ l 无菌水

2 μ l DNA 溶液

2 μ l BamHI 反应缓冲液,轻弹混匀。

1 单位 BamHI 限制性内切酶,轻弹混匀。

将上述反应混合物于 37°C 保温 1 小时。

加 2 μ l EDTA 终止反应液。此时的反应体系混合液可用于琼脂糖凝胶电泳。

2) EcoRI

取一支小指管按下列配方准备反应体系:

15 μ l 无菌水

2 μ l DNA 溶液

2 μ l EcoRI 反应缓冲液,轻弹混匀。

1 单位 EcoRI 酶,轻弹混匀。

将上述反应混合物于 37°C 保温 1 小时。

加 2 μ l EDTA 终止反应液。终止反应后的混合液可用于琼脂糖凝胶电泳。

3) HpaI

取一支小试管按下列配方准备反应体系:

15 μ l 无菌水

2 μ l DNA 溶液

2 μ l HpaI 反应缓冲液,轻弹混匀。

1 单位 HpaI 酶,轻弹混匀。

将上述反应混合物于 37°C 保温 1 小时。

加 2 μ l EDTA 终止反应液。终止反应后的混合液可用于琼脂糖凝胶电泳。

2. 琼脂糖凝胶电泳

配制 1%(W/V)琼脂糖悬浮液,用沸水浴促使其完全溶解,然后冷却到 50°C,加溴化乙锭溶液使其终浓度为 0.5 μ g/ml。快速将胶液倒到准备好的玻璃板上,根据需要控制其厚度为 2~4mm,插好梳子,将其放置 30 分钟左右,使琼脂糖凝结,小心拔下梳子。

将琼脂板置于电泳槽中,放置 30 分钟。

将 20 μ l 终止反应后的混和液与 10 μ l 电泳样品溶解液混匀,然后向每个样品孔加一个样品,加电泳缓冲液于电泳槽中,接通电源,控制 3V/cm 或 50~70V 的总电压。当染料移至胶的边缘时切断电源。取出胶于紫外灯下检测,DNA 片段将发出橙红色荧光。

画出板状凝胶图,标明各 DNA 带的位置。

实验六十一 Southern 印迹

一、原理

Southern 印迹是一项将 DNA 从琼脂糖凝胶上直接转移到放置在凝胶面上的硝酸纤维(NC)膜上的技术。DNA 被变性、中和并通过毛细作用在高盐缓冲液中转移。这种变性的、与滤膜结合的单链 DNA,在滤膜烤干后可永久地结合在滤膜上,再将其与放射性标记的探针杂交,即可检测杂交的 DNA。

二、试剂

变性液:0.15mol/L NaCl,0.5mol/L NaOH

中和液:0.5mol/L Tris-HCl(pH7.0),1.5mol/L NaCl

20×SSC:3mol/L NaCl,0.3mol/L 柠檬酸钠

以上溶液均在 100KPa 灭菌 20 分钟

2×SSC:用无菌移液管吸取 20×SSC 溶液 5ml,加无菌水 45ml

6×SSC:用无菌移液管吸取 20×SSC 溶液 15ml,加无菌水 75ml

三、操作方法

1. 在琼脂糖凝胶上电泳分离 DNA。取出凝胶,切去边缘多余部分,EB 染色,在紫外灯下照像(放一标尺,可从像片中读出 DNA 迁移的距离)。

2. 将凝胶上 DNA 进行碱变性处理:取 22 厘米×15 厘米瓷盆

一只,放入 0.15mol/L NaCl、0.5mol/L NaOH 溶液 200 毫升,把瓷盆放在 20°C 恒温振荡培养箱内,振荡 1 小时,使凝胶上的 ds DNA 转变为 ssDNA,然后用重蒸水冲洗凝胶几次。

3. 用 0.5mol/L Tris-HCl(pH7.0)、1.5mol/L NaCl 的溶液浸泡凝胶 20 分钟二次或在 20°C 中不断振荡 45 分钟,将凝胶中和至中性(要测 pH),防止凝胶的碱性破坏硝酸纤维膜。

4. 取一个瓷盆,在底部放一块玻璃板(或一块海棉)使盛器内的 20 倍 SSC 转移溶液低于玻板表面,在玻板表面盖一张 3mm 的新华二号滤纸,滤纸的两边浸没在 20 倍 SSC 溶液中,在玻璃与滤纸之间,赶掉所有气泡。

5. 把凝胶底面朝上放在滤纸上,赶走二层之间出现的气泡。

6. 裁剪一张硝酸纤维膜,其长与宽大于凝胶 1~2mm,并在角上做记号,以定滤膜方位。先把它放在 ddH₂O 中润湿后,再放在 2 倍 SSC 溶液中润湿 2~3 分钟,然后放在凝胶表面,二层之间不可有气泡。

7. 然后再把两张与滤膜一样大小的新华二号滤纸,在 2 倍 SSC 溶液中浸湿,覆盖在硝酸纤维膜上,同样要把气泡赶走。

8. 把一叠吸水纸(或卫生纸,约有 8~15cm 高,略小于滤纸),放置在滤纸上,在吸水纸上再放一块玻璃板和重约 500~1500 克的重物(见图)。

9. 把以上装置放置过夜或放置 12~24 小时,要防止震动,如果吸水纸已潮湿,要小心更换一次(用过之纸,不能重复使用,因为纸上有盐,且干燥后凹凸不平)。

转移的速率取决于 DNA 片段的大小与琼脂糖凝胶的孔径(浓度)。在 0.8% 凝胶上,小于 1kb 的 DNA,2 小时转移即可,15kb DNA 则需 15 小时以上。

10. 终止转移时,可移去上面吸水纸与滤纸,同时翻转取出凝胶与硝酸纤维膜,把凝胶的点样孔与硝酸纤维膜的相对应位置用铅笔或解剖针的针尖作好标记。此时凝胶已从 7~8mm 厚变成

1~2mm厚,可使凝胶在 EB 中再染色,观察是否还残留 DNA。

11. 把已转移了 DNA 的硝酸纤维素膜放在 20°C 的 6 倍 SSC(或 2 倍 SSC)溶液中振荡浸泡 5 分钟,然后放在滤纸上吸干溶液。再把它夹在二层滤纸之间,80°C 真空干燥 2 小时。

如果该膜不马上用于杂交,可封在塑料袋里,置冰箱保存数日,或置于 20°C 真空中,以滤纸包扎保存。

实验六十二 PCR 技术

一、原理

PCR(polymerase chain reaction)即聚合酶链式反应,该反应是在体外合成特异 DNA 片段的一种方法,是对传统的基因克隆、分子杂交和序列分析等分子生物学方法的丰富和发展,它能够快速、专一地扩增所希望的目的基因或 DNA 片段,可广泛应用于基础研究、生物工程和医学卫生领域。

PCR 是在一种高温 DNA 聚合酶(Thermostable Taq DNA Polymerase)的作用下通过引物和模板 DNA 的作用来扩增 DNA。模板可以是基因组 DNA、单链 DNA、克隆的 DNA 序列或 RNA(通过反转录成 cDNA)。当已知一个目的基因的序列时,就可以设计两个引物,引物的长度一般为 20~25 个碱基,其中一个和被扩增 DNA 的 3' 端互补,另一个是其 5' 端序列。当一个引物的 3'-端已经确定后,其 5' 端可以加上适当的内切酶切点等以利于 PCR 产物进一步克隆、转化、分析等。从理论上讲,PCR 反应很简单,在一个小 Eppendorf 管中加入 DNA 引物、dNTP、反应缓冲液和酶,然后滴入一滴矿物油以防止蒸发,放入已调好反应程序的温度控制仪上就可以了。典型的反应程序是 92~95℃ 用于变性 DNA; 10~60℃ 用于引物和模板退火; 72℃ 用于酶反应以催化 DNA 聚合。当然有时也可以把退火温度升高到 72℃ 进行,就只有两步的 PCR 反应。假设反应能够达到 100% 效率的话,那么在 20 个循环后将会有 10^6 倍 DNA 被扩增。

二、试剂

1. Taq DNA 聚合酶,很多公司有供应。
2. PCR 缓冲液:典型的 $10\times$ PCR 缓冲液成分为 100mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 500mmol/L KCl; 0.1% gelatin (明胶) 和 15mmol/L $MgCl_2$ 。一般的酶都配有缓冲液(10x),也可自己配制,灭菌后贮存于 $-20^{\circ}C$,也可配不含 Mg^{2+} 的 10 倍贮液。
3. dNTP:一般工作浓度为 200 μ mol/L,买到的 100mmol/L 贮液要存放在 $-70^{\circ}C$,可将此贮液用无离子水释成 2mmol/L 的 10 倍缓冲液,贮存于 $-20^{\circ}C$ 。
4. Mg^{2+} : Mg^{2+} 促进酶和模板的结合,注意 Mg^{2+} 放于 $-20^{\circ}C$ 时有时含有少量沉淀,反应前最好在 $37^{\circ}C$ 放 2~3 分钟。一般工作浓度为 1.5~5mmol/L。
5. 引物:合成后最好抽干,溶于无菌水或 TE 中,测定浓度,贮存于 $-20^{\circ}C$ 。
6. 矿物油:可直接购买或用石蜡油,有些矿物油会产生氧化现象,最好用锡铂纸封好。

三、操作方法

1. 20 μ l 总 PCR 反应体积

10~250ng 植物总 DNA(可参见植物 DNA 的提纯)

2 μ l $10\times$ PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})

1. 2 μ l 25mmol/L $MgCl_2$

2 μ l 2mmol/L dNTP

1 μ l 引物(1000ng/ μ l)

1 单位的 Taq DNA 聚合酶

加水至 20 μ l,然后加矿物油 1 滴,当 PCR 仪温度计至 $94^{\circ}C$ 时,立即放入反应管(变性温度也可选用 $92^{\circ}C$,需注意 PCR 仪的误差)。

2. PCR 反应可参见以下两个程序

① $94^{\circ}C$ 3 分钟

94°C	40 秒	} 35 次循环, 反应后, 4°C 或 -20°C 存放
55°C	1 分钟	
72°C	2 分钟	
72°C	10 分钟	

② 94°C 3 分钟

94°C	40 秒	} 5 次循环
65°C	1 分钟	
72°C	2 分钟	

94°C	40 秒	} 5 次循环
60°C	1 分钟	
72°C	2 分钟	

94°C	40 秒	} 15~20 循环
55°C	1 分钟	
72°C	2 分钟	

72°C 10 分钟, 反应后, 4°C 或 -20°C 存放

3. 取 5 μ l 反应液加入 1 μ l 上样缓冲液, 点样于 TAE 琼脂糖胶 (1%~4%)。

4. 点入适量的分子量标准物, 如 1kb marker 等。

5. 在 60~80V 下走电泳 1~2 小时。

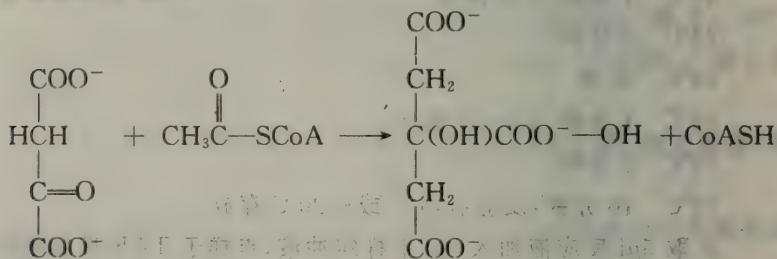
6. 把胶放入 1 μ g/ml 溴化乙锭中染色 20 分钟 (也可事先加 EB 于琼脂糖胶中, 1 μ l 10mg/ml 的 EB 加至 30ml 琼脂糖 TAE 胶中), 对于较小的 DNA 扩增片段, 最好电泳后染色。

7. 在紫外仪上观察结果并照像。

实验六十三 柠檬酸合酶的抑制

一、原理

乙酰 CoA 和草酰乙酸缩合生成柠檬酸的反应就是由柠檬酸合酶催化完成的。



该反应的 $\Delta G^0 = -7.7 \text{ kcal/mol}$ 。除乙酰 CoA 外, 氟乙酰 CoA 也是一个酶促反应的底物, 后者与草酰乙酸缩合生成氟柠檬酸, 而氟柠檬酸不能再进行代谢, 从而抑制柠檬酸循环使细胞死亡。

辅酶 A 的其它衍生物尽管能与该酶结合, 但不能参与该催化反应。例如, CoASH 经 $\text{BrCH}_2\text{COCH}_3$ 烷化生成的丙酮酰 CoA 就是如此。

柠檬酸合成酶的测定可通过其产物——CoASH 的定量测定来完成, 其中需另一种试剂, 5, 5'-二巯基硝基甲酸 (DTNB, Ellman's 试剂), 这种含二巯键的试剂可与自由巯基反应生成混合二巯键和一自由的 2-硝基-5-巯基苯甲酸, 后者具黄色, 在 412nm 处有最大光吸收。因此, 溶液的光吸收是单位时间内 CoASH 释放量的函数。注意, 如果酶活性中心具有必需的一SH 基, 此法不能使用。

二、试剂

1. 丙酮酰 CoA 的制备

①CoASH 的钠盐或锂盐均可。

②取 15ml 水加到 50ml 烧杯中,放一搅拌子,再向水中加 $20\mu\text{mol}$ 二硫苏糖醇,边向溶液表面轻吹氮气边用搅拌子搅拌,加二硫苏糖醇的目的是还原已被氧化了的 CoASH。再加 150mg CoASH(Na)_{2.5}(分子量约为 822.6),使其溶解,最后用 1mol/L NaOH 将 pH 值小心调到 8.0~8.2。

③取 $20\mu\text{l}$ 溴丙酮至 5ml 95% 的乙醇中,将此溶液加入到②步中的被还原的 CoASH 溶液中,pH 将会明显下降。再滴加 1mol/L NaOH 使 pH 回到 8.0~8.2,同时缓慢搅拌 3 分钟。最后滴加 6mol/L HCl 使 pH 降到 3 左右。

④该酸化溶液冻干以去除多余的溶剂和溶质。干粉溶解到约 2ml 的水中脱盐。

⑤用 Sephadex G-15(如 $1.5 \times 2.5\text{cm}$)进行脱盐,操作在 4°C 下进行。以水为洗脱液,监测淋出液的 A_{257} ,收集具有明显 A_{257} 峰的溶液,合并之,再冻干贮存待用。

2. 柠檬酸合成酶:商品酶常以 80 单位/mg 的浓度出售,其溶剂为 2.2mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH7),用水配制成 $40\mu\text{g/ml}$ 的贮存液。

3. DTNB 溶液:用 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配成 1mmol/L,其毫摩尔消光系数 $\epsilon_{412}=14.4$ 。用前配制,需冷藏,因其在 pH8.0 时能缓慢水解产生黄色物质。

4. 草酰乙酰溶液:用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配成 2mmol/L,该试剂不稳定,需新鲜配制,不用时冷藏。

5. Tris-HCl 缓冲液:0.05mol/L, pH8.0。

6. 乙酰 CoA 溶液:将 0.95mg 乙酰 CoA 溶于 2.5ml 水中配成约 0.4mmol/L,亦需新鲜配制且冷藏。

7. 丙酮酰 CoA 溶液:用水稀释该贮存液使其浓度为 2mmol/L,其毫摩尔消光系数 $\epsilon_{260}=15.4$ 。

三、操作方法

1. 准备工作

分光光度计需提前 30 分钟打开进行预热,使比色杯小室达到热平衡,约 30℃。记录纸速度为 13~15 厘米/分钟,仪器灵敏度要大,0.02A 就可引起足够水平的偏转。另需一水浴装置,温度约 30±2℃。

每个分析程序均需 4 个比色杯和 2 个空白对照,空白 1 用于分光光度计调零(双波长仪器则需 2 个),第 2 个在读其余 4 个比色杯的吸光值时使用。波长段为 $\lambda=412\text{nm}$,最好使用一次性塑料比色杯。

下面提供四个分析程序的操作,程序 1 是一套无抑制反应系统;程序 2、3 和 4 是有关抑制剂浓度增加效应的反应系统。

2. 分析程序 1

①按下表准备反应

试剂(μl)	空白	S_1	S_2	S_3	S_4
Tris 缓冲液	600	600	600	600	600
OAA	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100
乙酰 CoA	0	30	50	100	150
抑制剂	0	0	0	0	0
水	200	170	150	100	50

加完后,将比色杯倒置几次混匀,然后均放入水浴中保温 5 分钟以上,取出空白编号的比色杯,各加入 5 μl 酶液,用其调零,取出样品

光路的空白杯。

②分别加入酶液 0、5、0、0、0 μ l。酶液加完后如上法混匀，避免产生气泡。立即将 S₁ 杯放入仪器上并记录 1~5 分钟的光吸收。关掉记录仪，将纸卷回第一次记录开始的位置，使笔的位置设置在上次起点上方的 0.005A(光吸收)的位置。

③分别加酶液 0、0、5、0、0 μ l。同②一样测定 S₂ 杯，记录 1~5 分钟，再卷回纸，做一个步骤。

④分别加酶液 0、0、0、5、0 μ l。同③操作，记录光吸收，卷回纸、设置笔。

⑤分别加酶液 0、0、0、0、5 μ l。同前操作。程序 1 即告完成。

3. 分析程序 2

取一套新的比色杯按下列顺序添加试剂

试剂(μ l)	空白	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Tris 缓冲液	600	600	600	600	600
OAA	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100
乙酰 CoA	0	30	50	100	150
抑制剂 (丙酮酰 CoA)	0	10	10	10	10
水	200	160	140	90	40

其余步骤同分析程序 1 中的②~⑤步，这是低浓度抑制剂效应结果。

4. 分析程序 3

取一套新比色杯，同分析程序 1 和 2 那样分别添加 Tris 缓冲液、OAA、DTNB、乙酰 CoA，然后按如下方法加丙酮酰 CoA 和水。

试剂(μl)	空白	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
抑制剂 (丙酮酰 CoA)	0	20	20	20	20
水	200	150	130	80	30

同程序 1 一样重复②~⑤步。

5. 分析程序 4

取一套新比色杯,同分析程序 1 一样添加试剂 Tris 缓冲液、OAA、DTNB、乙酰 CoA,然后加丙酮酰 CoA 和水。

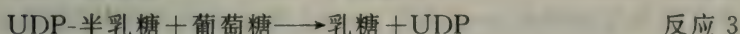
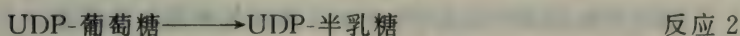
试剂(μl)	空白	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
抑制剂 (丙酮酰 CoA)	0	40	40	40	40
水	200	130	110	60	10

同程序 1 一样重复②~⑤步。

实验六十四 乳糖合成酶—— 一种酶调节系统

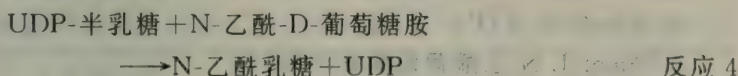
一、原理

乳糖合成酶存在于牛乳和哺乳动物的腺体内,它能催化UDP-半乳糖和葡萄糖生成乳糖。整个乳糖合成是这样的:



上述反应 1、2 和 3 分别由葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶、UDP-半乳糖 4'-异构酶和乳糖合成酶所催化。

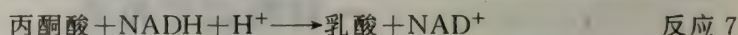
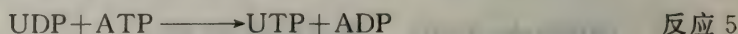
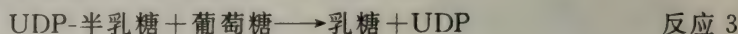
乳糖合成酶的活性维持需要两种蛋白,即 α -乳清蛋白和半乳糖苷转移酶。当二者独立存在时不能催化乳糖的合成。在半乳糖苷转移酶单独存在时,催化下列反应:



α -乳清蛋白是反应 4 的抑制剂,当没有 α -乳清蛋白存在时,尽管葡萄糖可以代替 N-乙酰-D-葡萄糖胺作为该酶的底物,但乳糖合成的速率很低,此时 N-乙酰-D-葡萄糖是半乳糖苷转移酶的优先底物。当 α -乳清蛋白存在时,它作为效应物改变了半乳糖苷转移酶的底物专一性,使葡萄糖成为优先底物。这个过程在生理调节过程中有非常重要的意义。

虽然控制特定的条件可以让反应 3 发生,但因为该反应没有

可藉以直接用光谱分析的物质(即在可见光区或紫外光区没有明显的变化),所以需要与其它反应偶联起来,使其终产物有显著的光吸收变化。本实验基于以下几步反应



其中反应 5、6 和 7 分别由核苷二磷酸激酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶所催化。控制实验条件,使反应 3 为限速反应,同时加入过量的 ATP、PEP 和 NADH,使得反应 7 中的光吸收变化与反应 3 中的 UDP 生成浓度成直线定量关系。而 NADH 在 340nm 有强的光吸收,用 NADH 的消失速率直接定量地反映出 UDP 的生成速率。

因本实验涉及反应较多,应小心控制各种加入的成分。

二、试剂

0.05mol/L Tris 缓冲液, pH7.5, 内含 0.004mol/L MnCl_2 ;

0.8mol/L 葡萄糖溶液;

α -乳清蛋白溶液(1.5mg/ml);

0.01mol/L 磷酸烯醇式丙酮酸溶液(PEP);

0.001mol/L ATP;

0.03mol/L N-乙酰葡萄糖胺(NAG);

半乳糖苷转移酶(0.2 单位/ml);

26mg/ml 粗制丙酮酸激酶;

0.002mol/L UDP-半乳糖;

0.002mol/L NADH;

偶联分析工作液(用前配制):

PEP 3.0ml

ATP 3.0ml

丙酮酸激酶 0.6ml

NADH 3.0ml;

带有记录仪和控温装置的分光光度计;

石英比色杯、恒温水浴槽。

三、实验内容

(一)半乳糖转移酶的最适浓度测定

按规定程序打开分光光度计进行预热,波长选定 340nm,调节石英杯的控温装置设定温度在 25~30°C 范围内的某个定值,同时调节水浴槽也在同样的温度,并将除半乳糖苷转移酶以外的所有试剂进行预保温,而半乳糖苷转移酶在冰浴中保存。按下表准备分析混和物(单位为 ml),一次分析一个,就 1 号来说,将每种试剂按规定数量加入到 1ml 比色杯中,若采用 3ml 比色杯,所有试剂均扩大到 3 倍。将比色杯置入到分光光度计的样品槽中并进行 1 分钟的温度平衡,然后记录 340nm 下在 3~5 分钟内的光吸收变化。1 号样代表空白(不含酶)。若有 4 个比色杯,可一次完成分析,否则只能逐个进行。除半乳糖苷转移酶外的各种试剂均按规定数量加入到比色杯内,水浴保温,然后向 2 号样中向入适量的半乳糖苷转移酶,置于分光光度计中测定其于 340nm 下 3~5 分钟内的光吸收变化。按此步骤重复测定 3、4、5 号样,记录各样的 ΔA 。

试剂(ml)	1	2	3	4	5
Tris/MnCl ₂ 缓冲液	0.3	0.25	0.20	0.15	0.10
工作液	均为 0.3ml				
葡萄糖或 NAG	均为 0.1ml				
α -乳清蛋白	均为 0.2ml				
UDP-半乳糖	均为 0.1ml				
半乳糖苷转移酶	0	0.05	0.10	0.15	0.20

用 N-乙酰葡萄糖胺代替葡萄糖作底物,重复进行测定,所加各种试剂的数量均在表中预以说明,没有改动,最后记录下各分析样品的 $\Delta A/\text{分钟}$ 。

(二) α -乳清蛋白的影响

在一系列的分析中通过改变 α -乳清蛋白的浓度估计出 α -乳清蛋白对(一)中的标准分析之影响。准备一个类似于前表的表,其中各比色杯内的 α -乳清蛋白进行调整,建议 α -乳清蛋白(1.5 mg/ml)的用量依次为 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.15 和 0.20 ml。对应地调整 Tris/ MnCl_2 缓冲液的体积,使其总体积保持一定值,其它试剂的量不变,但是,半乳糖苷转移酶的量可以从(一)中的结果选择,使 $\Delta A/\text{分钟}$ 大约为 0.10 即可。

(三) 以 NAG 为底物时 α -乳清蛋白的影响

用 N-乙酰葡萄糖胺代替葡萄糖作为底物准备另一系列样品,其中 α -乳清蛋白的量进行调整,分别为 0.005, 0.01, 0.02 和 0.05 ml, α -乳清蛋白的浓度仍为 1.5 mg/ml。记录各种不同量的 α -乳清蛋白分析样的 $\Delta A/\text{分钟}$ 。

四、结果分析

(一) 半乳糖转移酶的最适浓度测定

按速率($\Delta A/\text{分钟}$)对应于酶量(mg)作一表格。 $\Delta A/\text{分钟}$ 单位应该换算成另一种形式——单位时间内产物形成的量,通常以 $\mu\text{mol}/\text{分钟}$ 表示,其转换严格遵守 Beer 定律: $A = C\epsilon b$ 或 $C = \frac{A}{\epsilon b}$,其中 A 是每分钟内光吸收的变化, b 是光径长度(常为 1 cm), C 是产物的消光系数(NADH 为 $6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。样 1 为空白,样 2 至样 5 为底物的反应速率。以 $\mu\text{mol}/\text{分钟}$ 为 y 轴,酶浓度(酶活单位)为 x 轴作图,将各点连接成一条通过原点的直线。同样分析以 NAG 为底物时的类似情况。试说明此图如何用来决定一个未知催化活力的半乳糖转移酶的活力大小。

(二) α -乳清蛋白的影响

将所获得的 $\Delta A/\text{分钟}$ 这样的速率数据换算成每分钟所生成的产物的微摩尔数。利用所有数据(包括各分析样中的 α -乳清蛋白量, $\Delta A/\text{分钟}$, μmol 产物/分钟)作表格,最后以速率(μmol 产物/分钟, y 轴)对 α -乳清蛋白浓度($\text{mg}/\text{分析}$)作图。可获得什么样的图?是不是你期望的那样?如何利用此图决定一未知溶液中的 α -乳清蛋白浓度?利用 Lineweaver-Burk 或 Eisenthal 和 Cornish-Bowden 作图法测定 α -乳清蛋白的 K_m 值。

(三)以 NAG 为底物时 α -乳清蛋白的影响

将 $\Delta A/\text{分钟}$ 换算成 μmol 产物/分钟,同(Ⅱ)作图,解释该图的形状,在这些分析中 α -乳清蛋白的影响效果怎样?

五、思考题

1. 提出两种实验技术,以用于研究 α -乳清蛋白和半乳糖转移酶之间的复合关系。

2. 研究实验内容(三)中的结果,并提出确定 α -乳清蛋白作为一种抑制剂的实验方法。

3. 你怎样利用偶联法研究下列各问题:

①乳糖合成酶的底物专一性。

②在 α -乳清蛋白有或无两种情形下葡萄糖的 K_m 值。

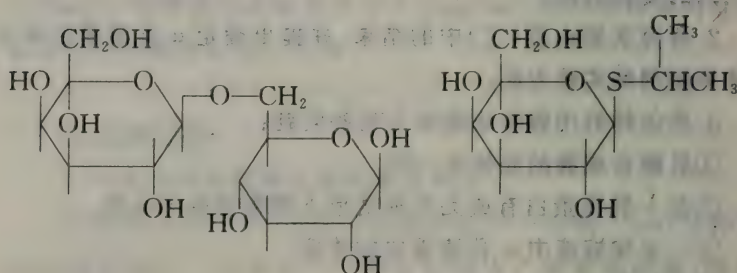
③一未知溶液中 α -乳清蛋白的浓度。

④未知溶液中 NAG 的浓度。

实验六十五 大肠杆菌中蛋白质合成的抑制

一、原理

β -半乳糖苷酶能水解半乳糖的 β -异头物所形成的糖苷键。在大肠杆菌中,该酶是一诱导酶,即当有高浓度的乳糖或异丙基- β -D-硫半乳糖苷(IPTG)存在时,该酶的活性增加。IPTG 是别乳糖的类似物,后者出现于乳糖代谢途径当中。



别乳糖

IPTG

β -半乳糖苷酶活性的增加可以通过这样几种方式达到,一为早已存在的蛋白质催化效率的提高,二是增加蛋白质合成,三是降低业已存在蛋白质的失活。催化效率的提高可能是别构效应的结果,也可能是磷酸化方式激活等。而蛋白质合成的增加则源于编码该酶的 mRNA 翻译活性提高,或通过提高该酶基因的转录活动进

而提高翻译活动。

目前已知道许多试剂对蛋白质的合成有影响,如氯霉素(CAP)能抑制肽链的延伸;利福平(RIF)能抑制 RNA 的合成,进一步影响了翻译。

半乳糖苷酶的活力测定用比色法进行。该酶催化硝基酚半乳糖苷水解产生半乳糖和硝基酚。硝基酚半乳糖苷(o-NPG)是无色的,而硝基酚在 420nm 有最大光吸收。因此可以利用硝基酚的产生(光吸收 A_{420} 增加值)来确定酶活力,酶活力单位定义为在一定条件下(温度、pH),每分钟生成 $1\mu\text{mol}$ 邻硝基酚所需要的酶量。

注意,因利福平也是有色物质,应选择合适的空白管,以消除它对光吸收值的影响。

二、试剂

大肠杆菌菌株(WR3102 和 WR1485):虽然许多菌株都有半乳糖苷酶的诱导效应,但这两个菌株较其它的效果好。

基本培养基(1 升):称取 10.5g K_2HPO_4 , 4.5g KH_2PO_4 , 1.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5g 柠檬酸三钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$,溶于 900ml 水中,高压灭菌,冷却后加入 5ml 甘油,1ml 的 1mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1mg 盐酸硫胺素(Vit B₁),用无菌水定容到 1 升。

0.1%(W/V)SDS。

氯仿:与 SDS 溶液一起使用,用于破细胞。

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG):用基本培养基配成 0.1mol/L,冰冻保存。

氯霉素(CAP):用基本培养基配成 1mg/ml,先用很小体积的甲醇将氯霉素溶解,再用基本培养基稀释到一定体积。

利福平(RIF):用基本培养基配成 1mg/ml,配法同氯霉素。

20%(W/V)葡萄糖溶液:用基本培养基配制。

邻硝基酚 β -半乳糖苷:用基本培养基配制成 4mg/ml。

1mol/L 碳酸钠:用水配制,其用途是终止酶促反应,同时使硝

基酚离子化产生颜色。

缓冲液 Z(1 升):取 16.1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75g KCl , 0.246g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 750ml 水, 加 2.7ml β -巯基乙醇混匀后调 pH 至 7.0, 最后定容到 1 升。

三、操作方法

细菌的培养:培养过夜的合适菌株继续在基本培养基上培养, 37°C 条件使群体数达 $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 细胞/ml, 此时 $A_{600} = 0.25 \sim 0.70$, 取对数期生长的细菌用冰浴冷却, 使之不能过度生长。

每组准备四套试管(12×75mm), 每套各 13 支, 第一套为对照; 第二套为氯霉素组(CAP), 用于氯霉素温育; 第三套为利福平组(RIF), 用于利福平培育; 第四套为葡萄糖组。另备两个试管(第 53 和 54 号)用于利福平单独存在时所产生的背景光吸收的校正。在试管架上将这些试管排成四排, 以利于各种独立培育条件之间的区别, 第五排上的试管用于测定 ΔA_{420} 。在每支管中加 0.5ml 缓冲液 Z 和 0.05ml SDS 溶液。

每组还应备四支大试管用于装大肠杆菌的培养物(10ml), 它们分别标明对照组、氯霉素组、利福平组和葡萄糖组。将它们置于 37°C 的水浴中。

在时间 t_0 时, 向四支大试管中各加 0.05ml IPTG 溶液, 开始诱导乳糖苷酶, 彻底混匀。

当加入 IPTG 后的 0, 3, 6, 9 和 12 分钟时, 从四个培养大试管中分别转移 0.5ml 到对应的小试管中, 并立即加 2 滴氯仿, 振摇 10~15 秒。

12 分钟的样品加完后, 立即进行下列操作, ①向对照组加 0.75ml 基本培养基; ②向氯霉素组加 0.75ml 氯霉素液; ③向利福平组加 0.75ml 利福平液; ④向葡萄糖组加 0.75ml 葡萄糖液。另两支对照试管加了 0.5ml 样后再加 RIF, 立即测定两者的 ΔA_{420} 值。并像其它试管一样加氯仿, 振摇。

在 15, 18, 22, 26, 30, 34, 42 分钟重复上述四个培养系统的取样, 向小试管各加 2 滴氯仿, 彻底混匀。

培育时间结束后开始酶活力的测定。在四套试管中有 13 个时间点, 向每支试管中加 0.2ml 底物, 对硝基苯酚- β -半乳糖苷, 向空白管 53、54 号各加 0.2ml 水。立即混匀所有试管, 室温下放置 20 分钟, 再向各管加 0.5ml 碳酸钠溶液, 以终止酶反应。

以水空白来测定所有小试管中溶液的 A_{420} , 小心勿将氯仿转移到比色皿中, 否则会产生雾状物。要注意经常清洗比色皿, 因其壁上会有不溶性沉淀出现。仔细操作, 勿搞混对应关系, 对利福平组的试管样液的 A_{420} 要用 53、54 号管的 A_{420} 去校正, 或以利福平空白管校正仪器零点。

四、结果

就四种培育条件, 各以 A_{420} 对 IPTG 诱导时间作图, 可得四个结果, 分别分析之。注意利福平的校正问题。

实验六十六 血清胆固醇的测定

一、原理

血清经无水甲醇处理后蛋白质被沉淀,胆固醇则溶解在无水甲醇中。甲醇提取液与硫磷铁试剂反应后生成有色物质,其呈色度与胆固醇含量成正比,可于 550nm 波长下进行比色测定。正常血清中胆固醇的含量有随年龄增大而增加的趋势,其平均正常值在 110~220mg/100ml。

二、试剂

1. 0mg/ml 胆固醇贮存液:将 100.0mg 胆固醇溶于 100ml 无水甲醇中。

0.02mg/ml 胆固醇工作液:取 2ml 胆固醇贮存液加 98ml 无水甲醇。

三氯化铁溶液:5.0g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 200ml 浓磷酸中。

磷硫铁试剂(P-Sc-Fe 试剂):取 40ml 的三氯化铁溶液用浓硫酸定容到 500ml。

三、操作方法

1. 取两支带帽试管,各加入 0.1ml 血清和 10ml 无水甲醇,立即用力振荡(或于 Vortex mixer 上混 10 秒钟)。

2. 将两支试管于台式离心机上高速(3000rpm)离心 5 分钟,各取 2.0ml 上清液转移到相应的锥形瓶中。

3. 取 0.02mg/ml 胆固醇工作液 2.0ml 转移到第三个锥形瓶

中,用作标准。

4. 取 2.0ml 甲醇加入到第四个锥形瓶中,用做空白。

5. 向 4 个锥形瓶中缓慢加入 2.0ml 的磷硫铁试剂,轻轻振荡均匀。

6. 封住锥形瓶口,置室温 30 分钟,所生颜色在 1 小时内稳定。

7. 将上述各锥形瓶中的有色溶液于 550nm 下进行比色测定,作记录。

四、结果

$$\text{mg 胆固醇}\% = \frac{A_{\text{待测样}}}{A_{\text{标准样}}} \times 200$$

实验六十七 血液中尿素的测定

一、原理

尿素是含氮物质代谢的终产物,正常情况下由肾脏排出,其含量在 8~20mg 尿素/100ml 血。

本实验中,利用脲酶将尿素水解为 NH_3 和 CO_2 。 NH_3 在硝基高铁氰化钠和次氯酸试剂的存在下转化为靛酚蓝,该有色物在 625nm 下有最大光吸收。利用已知浓度的标准品求出未知样中的尿素含量。

二、试剂

2.5% 硝基高铁氰化钠:用水溶解,棕色瓶贮存。

碱性次氯酸试剂:取 25ml 的 2.5mol/L NaOH (10%) 和 4.0ml 的 Chlorox 混匀,用水定容到 100ml,棕色瓶冷藏。

酚显色试剂:取 5.0g 酚于 100ml 容量瓶口,加 80ml 水和 1.0ml 硝基高铁氰化钠溶液,最后定容到 100ml,棕色瓶冷藏。

10mg/ml 尿素贮液:2.14g 尿素用 100ml 水溶解,再加 1 滴三氯甲烷(实际为 10.0mg 尿素氮/ml)。

0.2mg/ml 尿素工作液(实为 0.2mg 尿素氮/ml):取 2ml 贮液加 98ml 水。

脲酶溶液:5ml 脲酶-甘油提取物用 100ml EDTA 缓冲液定容到 100ml,棕色瓶冷藏。

EDTA 缓冲液(pH6.5):5.0g EDTA 用 400ml H_2O 溶解,用 10%NaOH 调 pH 至 6.5(约需 17~18ml),最后定容到 500ml。

三、操作方法

取试管编号,按下表顺序加试剂:

试剂(ml)	1	2	3	4	5
0.2mg/ml 标准样	—	—	—	0.02	0.02
H ₂ O	0.02	—	—	—	—
血清	—	0.02	0.02	—	—
脲酶	均为 0.02ml,振匀后于 37°C 保温 30 分钟				
酚显色试剂	均为 1.0ml				
碱性次氯酸试剂	均为 1.0ml				
	混匀后,室温放置 40 分钟后转移到比色管,并用水稀释至 25ml,混匀。以 1# 为空白于 625nm 波长下比色测定				
A ₆₂₅					

结果用 mg/100ml 血清表示。

附录一 生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退,不大声谈笑。

2. 实验前必须认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法,否则不能开始实验。

3. 实验过程中要听从教员的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教员检查同意,方可离开实验室。

4. 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,仪器须洗净放好,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。

5. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教员,不得擅自动手检修。

6. 实验室内严禁吸烟!煤气灯应随用随关,严格做到:人在火在,人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。实验完毕,应立即关好煤气开关和水笼头,拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查,严防发生安全事故。

7. 废液体可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须

先用水稀释。废纸、火柴头及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内,不能倒入水槽或到处乱扔。

8. 仪器损坏时,应如实向教员报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。

9. 实验室内一切物品,未经本室负责教员批准,严禁携出室外,借物必须办理登记手续。

10. 每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

附录二 实验室安全及防护知识

(一) 实验室安全知识

在生物化学实验室中,经常与毒性很强,有腐蚀性,易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触,常常使用易碎的玻璃和瓷质器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行着紧张而细致的工作,因此,必须十分重视安全工作。

1. 进入实验室开始工作前应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。离开实验室时,一定要将室内检查一遍,应将水、电、煤气的开关关好,门窗锁好。

2. 使用煤气灯时,应先将火柴点燃,一手执火柴紧靠近灯口,一手慢开煤气门。不能先开煤气门,后燃火柴。灯焰大小和火力强弱,应根据实验的需要来调节。用火时,应做到火着人在,人走火灭。

3. 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等)时,严防触电;绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。检查电器设备是否漏电时,应将手背轻轻触及仪器表面。凡是漏电的仪器,一律不能使用。

4. 使用浓酸、浓碱,必须极为小心地操作,防止溅失。用吸量管量取这些试剂时,必须使用橡皮球,绝对不能用品口吸取。若不慎溅在实验台或地面,必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤应立即治疗。

5. 使用可燃物,特别是易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇、苯、金属钠

等)时,应特别小心。不要大量放在桌上,更不应放在靠似火焰处。只有在远离火源时,或将火焰熄灭后,才可大量倾倒这类液体。低沸点的有机溶剂不准在火焰上直接加热,只能在水浴上利用迴流冷凝管加热或蒸馏。

6. 如果不慎倾出了相当量的易燃液体,则应按下法处理:

(1)立即关闭室内所有的火源和电加热器。

(2)关门,开启小窗及窗户。

(3)用毛巾或抹布擦拭撒出的液体,并将液体拧到大的容器中,然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

7. 用油浴操作时,应小心加热,不断用温度计测量,不要使温度超过油的燃烧温度。

8. 易燃和易爆炸物质的残渣(如金属钠、白磷、火柴头)不得倒入污物桶或水槽中,应收集在指定的容器内。

9. 废液,特别是强酸和强碱不能直接倒在水槽中,应先稀释,然后倒入水槽,再用大量自来水冲洗水槽及下水道。

10. 毒物应按实验室的规定办理审批手续后领取,使用时严格操作,用后妥善处理。

(二)实验室灭火法

实验中一旦发生了火灾切不可惊慌失措,应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电源。然后根据具体情况积极正确地进行抢救和灭火。常用的方法有:

1. 在可燃液体燃着时,应立刻拿开着火区域内的一切可燃物质,关闭通风器,防止扩大燃烧。若着火面积较小,可用石棉布、湿布、铁片或沙土覆盖,隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻,避免碰坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃器皿,导致更多的溶剂流出而再着火。

2. 酒精及其它可溶于水的液体着火时,可用水灭火。

3. 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时,应用石棉布或砂土扑灭。绝对不能用水,否则反而会扩大燃烧面积。

4. 金属钠着火时,可把砂子倒在它的上面。

附表 1 某些物质燃烧时应用的灭火剂

燃 烧 物 质	应用灭火剂	燃 烧 物 质	应用灭火剂
苯 胺	泡沫,二氧化碳	松 节 油	喷射水,泡沫
乙 炔	水蒸汽,二氧化碳	火 漆	水
丙 酮	泡沫,二氧化碳, 四氯化碳	磷	砂,二氧化碳, 泡沫,水
硝基化合物	泡沫	赛路珞	水
氯乙烷	泡沫,二氧化碳	纤维素	水
钾,钠,钙,镁	砂	橡 胶	水
松 香	水,泡沫	煤 油	泡沫,二氧化碳, 四氯化碳
苯	泡沫,二氧化碳, 四氯化碳	漆	泡沫
重 油 润 滑 油 植 物 油 石 油	喷射水,泡沫	蜡	泡沫
		石 腊	喷射水,二氧化碳
		二硫化碳	泡沫,二氧化碳
醚 类(高沸 点 175°C 以上)	水	醇 类(高沸 点 175°C 以上)	水
醚 类(低沸 点 175°C 以下)	泡沫,二氧化碳	醇 类(低沸 点 175°C 以下)	泡沫,二氧化碳

5. 导线着火时不能用水及二氧化碳灭火器,应切断电源或用四氯化碳灭火器。

6. 衣服被烧着时切忌奔走,可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动,以灭火。

7. 发生火灾时应注意保护现场。较大的着火事故应立即报警。

(三)实验室急救

在实验过程中不慎发生受伤事故,应立即采取适当的急救措施。

1. 受玻璃割伤及其它机械损伤:首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物碎片,然后用硼酸水洗净,再涂擦碘酒或红汞水,必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血,应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血,立即到医院诊治。

2. 烫伤:一般用浓的(90%~95%)酒精消毒后,涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿(一级灼伤),可擦医用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处;若皮肤起泡(二级灼伤),不要弄破水泡,防止感染;若伤处皮肤呈棕色或黑色(三级灼伤),应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好,急送医院治疗。

3. 强碱(如氢氧化钠,氢氧化钾)、钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时,要先用大量自来水冲洗,再用5%硼酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。

4. 强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时,应立即用大量自来水冲洗,再以5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。

5. 如酚触及皮肤引起灼伤,可用酒精洗涤。

6. 若煤气中毒时,应到室外呼吸新鲜空气,若严重时应立即到医院诊治。

7. 水银容易由呼吸道进入人体,也可以经皮肤直接吸收而引起积累性中毒。严重中毒的征象是口中有金属味,呼出气体也有气味;流唾液,牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色;淋巴腺及唾腺肿大。若不慎中毒时,应送医院急救。急性中毒时,通常用炭粉或呕吐剂彻底洗胃,或者食入蛋白(如1升牛奶加三个鸡蛋清)或蓖麻油解毒并使之呕吐。

8. 触电:触电时可按下述方法之一切断电路:

(1)关闭电源;(2)用干木棍使导线与被害者分开;(3)使被害者和土地分离,急救时急救者必须做好防止触电的安全措施,手或脚必须绝缘。

附录三 实验室常识

1. 挪动干净玻璃仪器时,勿使手指接触仪器内部。

2. 量瓶是量器,不要用量瓶作盛器。量瓶等带有磨口玻璃塞的仪器的塞子,不要盖错。带玻璃塞的仪器和玻璃瓶等,如果暂时不使用,要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

3. 洗净的仪器要放在架上或干净纱布上晾干,不能用抹布擦拭,更不能用抹布擦拭仪器内壁。

4. 不要用棉花代替橡皮塞或木塞堵瓶口或试管口。

5. 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。

6. 不要用滤纸称量药品,更不能用滤纸作记录。

7. 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口,以免掺混。

8. 标签纸的大小应与容器相称,或用大小相当的白纸,绝对不能用滤纸。标签上要写明物质的名称、规格和浓度、配制的日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的 $\frac{2}{3}$ 处,试管等细长形容器则贴在上部。

9. 使用铅笔写标记时,要在玻璃仪器的磨砂玻璃处。如用玻璃铅笔,则写在玻璃容器的光滑面上。

10. 取用试剂和标准溶液后,需立即将瓶塞严,放回原处。取出的试剂和标准溶液,如未用尽,切勿倒回瓶内,以免掺混。

11. 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味气体的实验,均应在通风橱内进行。橱门应紧闭,非必要时不能打开。

12. 用实验动物进行实验时,不许戏弄动物。进行杀死或解剖

等操作,必须按照规定方法进行。绝对不能用动物、手术器械或药物开玩笑。

13. 使用贵重仪器如分析天平、比色计、分光光度计、酸度计、冰冻离心机等,应十分重视,加倍爱护。使用前,应熟知使用方法。若有问题,随时请指导实验的教师解答。使用时,要严格遵守操作规程。发生故障时,应立即关闭仪器,请告知管理人员,不得擅自拆修。

14. 一般容量仪器的容积都是在 20°C 下校准的。使用时如温度差异在 5°C 以内,容积改变不大,可以忽略不计。现将我国国家科委计量局制定的容量仪器标准容量的允许误差列于附表 2。

附表 2 在标准温度 20℃ 时标准容量的允差

容量 (毫升)	标准容量的允差 (毫升)											
	一等容量瓶		二等容量瓶		量筒		量杯		直通活门 滴管及微量 滴管		侧边活门 滴管及无 活门滴管	
	量入式	量出式	量入式	量出式	量入式	量出式	量入式	量出式	一等	二等	一等	二等
2000±	0.50	1.00	1.00	2.00	6.0	12.0						
1000±	0.30	0.60	0.60	1.00	4.0	8.0	10.0					
500±	0.15	0.30	0.30	0.60	2.0	4.0	6.0					
250±	0.10	0.20	0.20	0.40	1.0	2.0	3.0					
200±	0.10	0.20	0.20	0.40								
100±	0.10	0.20	0.20	0.40	0.4	0.8	1.5	0.10	0.20	0.12	0.24	0.10
50±	0.05	0.10	0.10	0.20	0.3	0.6	1.0	0.05	0.10	0.06	0.12	0.08
40±												
25±	0.03	0.06	0.06	0.12	0.2	0.4	0.6	0.03	0.06	0.05	0.10	0.06
20±												

标准容量的允差（毫升）																
容量 (毫升)	一等容量瓶		二等容量瓶		量筒		量杯	直通活门 滴管及微量 滴管		侧边活门 滴管及无 活门滴管		吸 管			有分 度完 全流 出式 微量 吸管	
	量入式	量出式	量入式	量出式	量入式	量出式	量出式	量出式	一等	二等	一等	二等	无分度只有 一标线者	有分度者和 无分度只有 二标线者		
														一等		二等
15±													0.03	0.06	0.04	0.08
11±													0.02	0.04	0.03	0.06
10±	0.02	0.04			0.2	0.4	0.6	0.0200.040					0.02	0.04	0.03	0.06
5±					0.2	0.4		0.0100.030					0.01	0.03	0.02	0.04
4±													0.01	0.03	0.02	0.04
2±								0.0060.015					0.006	0.015	0.01	0.02
1±								0.0060.015					0.006	0.015	0.01	0.02
0.5±													0.006	0.015	0.01	0.02
0.2±																0.002
0.1±																0.001

附录四 常用数据表

1. 元素的原子量表(录自 1977 年国际原子量表,并全部取四位有效数字)

元 素	符 号	原 子 量	原子序数	元 素	符 号	原 子 量	原子序数
钪	Sc	44.96	21	铍	Be	9.012	4
钛	Ti	47.88	22	硼	B	10.81	5
钒	V	50.94	23	碳	C	12.01	6
铬	Cr	52.00	24	氮	N	14.01	7
锰	Mn	54.94	25	氧	O	16.00	8
铁	Fe	55.85	26	氟	F	18.99	9
钴	Co	58.93	27	氖	Ne	20.18	10
镍	Ni	58.71	28	钠	Na	22.99	11
铜	Cu	63.55	29	镁	Mg	24.31	12
镉	Cd	112.4	48	铝	Al	26.98	13
汞	Hg	200.6	80	硅	Si	28.09	14
				磷	P	30.97	15
				硫	S	32.07	16
				氯	Cl	35.45	17
				氩	Ar	39.95	18
				钾	K	39.10	19
				钙	Ca	40.08	20
				钪	Sc	44.96	21
				钛	Ti	47.88	22
				钒	V	50.94	23
				铬	Cr	52.00	24
				锰	Mn	54.94	25
				铁	Fe	55.85	26
				钴	Co	58.93	27
				镍	Ni	58.71	28
				铜	Cu	63.55	29
				镉	Cd	112.4	48
				汞	Hg	200.6	80

续表

元 素	符 号	原 子 量	原子序数	元 素	符 号	原 子 量	原子序数
铒	Er	167.3	68	铕	Pu	[244]	94
镱	Es	[254]	99	镭	Ra	226.0	88
铕	Eu	152.0	63	铷	Rb	85.47	37
氟	F	19.00	9	铯	Re	186.2	75
铁	Fe	55.85	26	铈	Rh	102.9	45
钆	Fm	[257]	100	钷	Rn	[222]	86
钆	Fr	[223]	87	钷	Ru	101.1	44
镓	Ga	69.72	31	硫	S	32.06	16
钆	Gd	157.3	64	锑	Sb	121.8	51
锗	Ge	72.59	32	钪	Sc	44.96	21
氢	H	1.008	1	钪	Se	78.96	34
氦	He	4.003	2	钪	Si	28.09	14
铪	Hf	178.5	72	钪	Sm	150.4	62
汞	Hg	200.6	80	钪	Sn	118.7	50
铊	Ho	164.9	67	铈	Sr	87.62	38
碘	I	126.9	53	铈	Ta	180.9	73
铟	In	114.8	49	铈	Tb	158.9	65
铱	Ir	192.2	77	铈	Tc	[97]	43
钾	K	39.10	19	铈	Te	127.6	52
氩	Kr	83.80	36	铈	Th	232.0	90

续表

元 素	符 号	原 子 量	原子序数	元 素	符 号	原 子 量	原子序数
镧	La	138.9	57	钪	Ti	47.90	22
铈	Li	6.941	3	铈	Tl	204.4	81
镨	Lu	175.0	71	铈	Tm	168.9	69
钕	Lr	[260]	103	铈	U	238.0	92
钷	Md	[258]	101	钪	V	50.94	23
钆	Mg	24.31	12	钪	W	183.9	74
铈	Mn	54.94	25	钪	Xe	131.3	54
铈	Mo	95.94	42	铈	Y	88.91	39
氮	N	14.01	7	铈	Yb	173.0	70
钠	Na	22.99	11	铈	Zn	65.38	30
铈	Nb	92.91	41	铈	Zr	91.22	40
铈	Nd	144.2	60	铈	Os	190.2	76
氮	Ne	20.18	10	磷	P	30.97	15
镍	Ni	58.70	28	磷	Pa	231.0	91
镍	No	[259]	102				
铈	Np	237.0	93	氧	O	16.00	8

注：原子量加括号的为放射性元素的半衰期最长的同位素的质量数。

2. 常用酸碱百分浓度、比重和当量浓度的关系

百分 浓度 %	H ₂ SO ₄		HNO ₃		HCl		KOH		NaOH		氨溶液	
	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N
2	1.013		1.011		1.009		1.016		1.023		0.992	
4	1.027		1.022		1.019		1.033		1.046		0.983	
6	1.040		1.033		1.029		1.048		1.069		0.973	
8	1.055		1.044		1.039		1.065		1.092		0.967	
10	1.069	2.1	1.056	1.7	1.049	2.9	1.082	1.9	1.115	2.8	0.960	5.6
12	1.083		1.068		1.059		1.100		1.137		0.953	
14	1.098		1.080		1.069		1.118		1.159		0.946	
16	1.112		1.093		1.079		1.137		1.181		0.939	
18	1.127		1.106		1.089		1.156		1.213		0.932	
20	1.143	4.7	1.119	3.6	1.100	6	1.176	4.2	1.225	6.1	0.926	10.9
22	1.158		1.132		1.110		1.196		1.247		0.919	
24	1.178		1.145		1.121		1.217		1.268		0.913	12.9
26	1.190		1.158		1.132		1.240		1.289		0.908	13.9
28	1.205		1.171		1.142		1.263		1.310		0.903	
30	1.224	7.5	1.184	5.6	1.152	9.5	1.268	6.8	1.332	10	0.898	15.8
32	1.238		1.198		1.163		1.310		1.352		0.893	
34	1.255		1.211		1.173		1.334		1.374		0.889	
36	1.273		1.225		1.183	11.7	1.358		1.395		0.884	18.7
38	1.290		1.238		1.194	12.4	1.384		1.416			
40	1.307	10.7	1.251	7.9			1.411	10.1	1.437	14.4		
42	1.324		1.264				1.437		1.458			
44	1.342		1.277				1.460		1.478			
46	1.361		1.290				1.485		1.499			
48	1.380		1.303				1.511		1.519			
50	1.399	14.3	1.316	10.4			1.538	13.7	1.540	19.3		
52	1.419		1.328				1.564		1.560			
54	1.439		1.340				1.590		1.580			
56	1.460		1.351				1.616	16.1	1.601			

续表

百分 浓度 %	H ₂ SO ₄		HNO ₃		HCl		KOH		NaOH		氨溶液	
	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N	比 重	N
58	1.482		1.362						1.622			
60	1.503	18.4	1.373	13.3					1.643	24.6		
62	1.525		1.384									
64	1.547		1.394									
66	1.571		1.403	14.6								
68	1.594		1.412	15.2								
70	1.617	23.1	1.421	15.8								
72	1.640		1.429									
74	1.664		1.437									
76	1.687		1.445									
78	1.710		1.453									
80	1.732	28.2	1.460	18.5								
82	1.755		1.467									
84	1.776		1.474									
86	1.793		1.480									
88	1.808		1.486									
90	1.819	33.4	1.491	23.1								
92	1.830		1.496									
94	1.837		1.500									
96	1.840	36	1.504									
98	1.841	36.8	1.510									
100	1.838	37.5	1.522	24								

注：表中当量浓度(N)与比重(D)、百分浓度(A)的关系式如下：

$$N = \frac{D \times A \times 10}{\text{当量}}$$

3. 实验室中常用酸碱的比重和浓度的关系

名 称	分子式	分子量	比 重	百分浓度 % (W/W)	当量浓度 (粗略)N	配 1 升 1 N 溶液所 需毫升数
盐 酸	HCl	36.47	1.19	37.2	12.0	84
				1.18	35.4	11.8
				1.10	20.0	6.0
硫 酸	H ₂ SO ₄	98.09	1.84	95.6	36.0	28
			1.18	24.8	6.0	
硝 酸	HNO ₃	63.02	1.42	70.98	16.0	63
			1.40	65.3	14.5	
			1.20	32.36	6.1	
冰乙酸	CH ₃ COOH	60.05	1.05	99.5	17.4	59
乙 酸	CH ₃ COOH		1.075	80.0	14.3	
磷 酸	H ₃ PO ₄	98.06	1.71	85.0	15,30,45 (依反应而定)	67(以 15N 计)
氨 水	NH ₄ OH	35.05	0.90		15	67
			0.904	27.0	14.3	70
			0.91	25.0	13.4	
			0.96	10.0	5.6	
氢氧化 钠溶液	NaOH	40.0	1.5	50.0	19	53

4. 常用固态化合物的当量浓度(或克分子浓度)配制参考表

名 称		分 子 量	浓 度	
			<i>M</i> 或 <i>N</i>	克/升
草 酸	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	126.08	1 <i>N</i>	63.04 ✓
柠 檬 酸	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	210.14	0.1 <i>N</i>	7.00
氢氧化钾	KOH	56.10	5 <i>N</i>	280.50
氢氧化钠	NaOH	40.00	1 <i>N</i>	40.00
碳 酸 钠	Na_2CO_3	106.00	1 <i>N</i>	53.00
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.20	1 <i>M</i>	358.20
磷酸二氢钾	KH_2PO_4	136.10	1/15 <i>M</i>	9.08
重铬酸钾	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	294.20	0.1 <i>N</i>	4.9035
碘 化 钾	KI	166.00	0.5 <i>N</i>	83.00
高锰酸钾	KMnO_4	158.00	0.1 <i>N</i>	3.16
乙 酸 钠	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	82.04	1 <i>N</i>	82.04
硫代硫酸钠	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	248.20	0.1 <i>N</i>	24.82

附录五 常见蛋白质分子量参考值

(单位: dalton)

蛋 白 质	分子量
甲状腺球蛋白[thyroglobulin(bovine thyroid)]	669000
巨豆尿素酶[urease(Jack bean)]	480000
铁蛋白[ferritin(horse spleen)]	440000
β -葡萄糖醛酸苷酶[β -glucuronidase(calf liver)]	280000
过氧化氢酶[catalase(bovine liver)]	232000
藻青蛋白[phycocyanin]	232000
肌球蛋白[myosin]	220000
黄嘌呤氧化酶[xanthine oxidase(cream)]	181000
牛 γ -球蛋白[bovine gamma globulin]	165000
人 γ -球蛋白[human gamma globulin]	165000
醛缩酶[aldolase(rabbit muscle)]	158000
人血浆铜蓝蛋白[human ceruloplasmin]	157000
酵母醇脱氢酶[yeast alcohol dehydrogenase]	140000
兔肌脱氢酶[rabbit muscle dehydrogenase]	135000
血清白蛋白二聚体[serum albumin dimer]	135000
兔肌丙糖磷酸脱氢酶[rabbit muscle triose phosphate dehydrogenase]	13000
β -半乳糖苷酶[β -galactosidase]	130000
碱性磷酸单酯酶[phosphate monoesterase alkaline]	100000
副肌球蛋白[paramyosin]	100000
磷酸化酶 a[phosphorylase a]	94000
牛乳过氧化物酶[cow's milk lactoperoxidase]	83000
大肠杆菌磷酸化酶[E. Coli phosphatase]	78000
血清白蛋白[serum albumin]	68000
牛转铁朊[bovine transferrin]	67000
猪心苹果酸脱氢酶[pig heart malate dehydrogenase]	63000

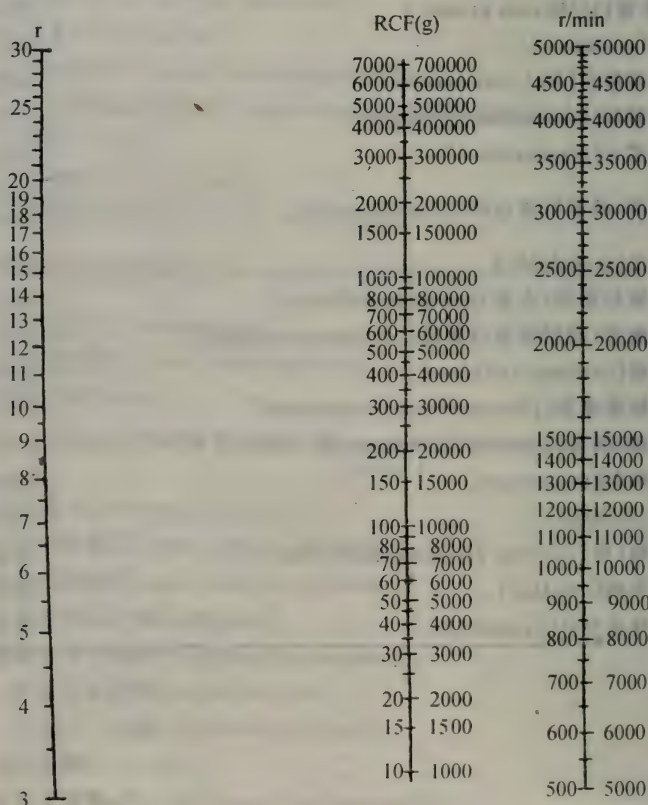
续表

蛋 白 质	分子量
L-氨基酸氧化酶[L-amino acid oxidase]	63000
丙酮酸激酶[pyruvate kinase]	57000
谷氨酸脱氢酶[glutamate dehydrogenase]	53000
亮氨酸胺酶[leucine amino peptidase]	53000
γ -球蛋白, H 链[γ -globulin, H chain]	50000
延胡索酸酶(反丁烯二酸酶)[fumarase]	49000
脂肪酶[lipase (porcine pancreas)]	48000
卵清蛋白[ovalbumin]	43000
醇脱氢酶(肝)[alcohol dehydrogenase(liver)]	42000
金黄色葡萄球菌蛋白A[staphylococcus aureus protein A]	41000
烯醇酶[enolase]	41000
肌酸激酶[creatine kinase]	40000
D-氨基酸氧化酶[D-amino acid oxidase]	37000
甘油醛磷酸脱氢酶[glyceraldehyde phosphate dehydro-genase]	36000
原肌球蛋白[tropomyosin]	36000
乳酸脱氢酶[lactate dehydrogenase]	36000
胃蛋白酶[pepsin]	35000
天门冬氨酸氨甲酰基转移酶 C 链[aspartate transcarbamy lase, C chain]	34000
羧肽酶 A[carboxypeptidase A]	34000
牛碳酸酐酶[bovine carbonic anhydrase]	29000
人碳酸酐酶[human carbonic anhydrase]	29000
枯草杆菌蛋白酶[subtilisin]	27600
胰凝乳蛋白酶原 A[chymotrypsinogen A]	25000
α -胰凝乳蛋白酶[α -chymotrypsin]	25000
γ -球蛋白, L 链[γ -globulin, L-chain]	23500
胰蛋白酶[trypsin]	23300
木瓜蛋白酶(羧甲基)[papain(carboxymethyl)]	23000
大豆胰蛋白酶抑制剂[soya bean trypsin inhibitor]	21500
β -乳球蛋白 B[β -lactoglobulin B]	18400

续表

蛋 白 质	分子量
烟草花叶病毒外壳蛋白[TMV coat protein]	17500
马肌红蛋白[equine myoglobin]	17500
鲸肌红蛋白[whale myoglobin]	17500
天门冬氨酸氨甲酰基转移酶,R 链[aspartate transcarbamylase, R chain]	17000
血红蛋白[h(a)emoglobin]	15500
α -乳清蛋白[α -lactalbumin]	15500
Q β 外壳蛋白[Q β coat protein]	15000
溶菌酶[lysozyme]	14300
R17 外壳蛋白[R17 coat protein]	13750
核糖核酸酶[ribonuclease 或 RNase]	13700
细胞色素 C[cytochrome C]	12200
糜蛋白酶(胰凝乳蛋白酶)[chymotrypsin]	11000 或 13000
肌红蛋白[myoglobin]	17200
胰蛋白酶抑制剂(大豆)[ptrypsin inhibitor]	22500
糜蛋白酶原(胰凝乳蛋白酶原)[chymotrypsinogen]	25700
碳酸酐酶[carbonic anhydrase]	29000
转磷酸核糖基酶[phosphoribosyl transferase]	35000
醇脱氢酶(酵母)[alcohol dehydrogenase (yeast)]	37000
胃蛋白酶原[pepsinogen]	40000
醛缩酶[aldolase]	40000
醇脱氢酶(肝)[alcohol dehydrogenase (liver)]	41000
过氧化氢酶[catalase]	60000
甲状腺球蛋白[thyroglobulin]	16500

附录六 离心机转数(转/秒)与相对离心力(RCF)的换算



附图 离心机转数与离心力的列线图

r 为离心机头的半径(角头),或离心管中轴底部内壁到离心机转轴中心的距离(甩平头),单位为厘米。

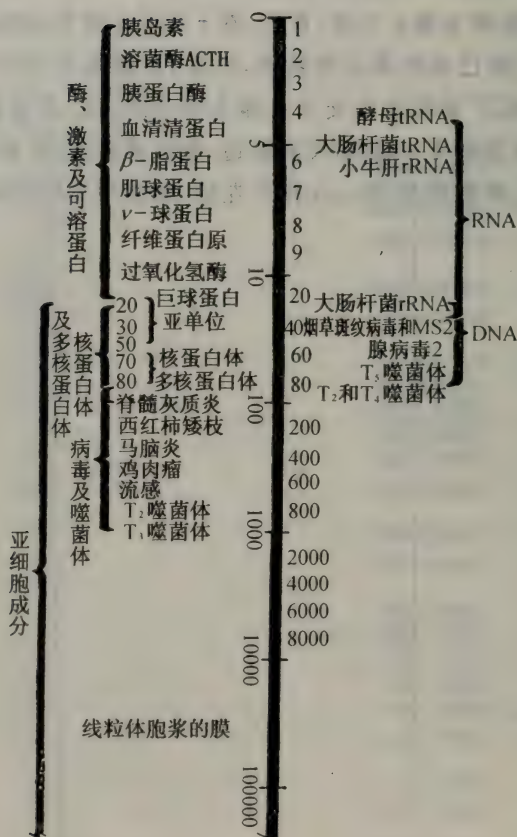
RCF 为相对离心力,以地心引力即重力加速度的倍数来表示,一般用 g (或数字 $\times g$)表示。

附图是由下述公式计算而来的:

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$$

将离心机转数换算为离心力时,首先,在 r 标尺上取已知的半径和在 rpm 标尺上取已知的离心机转数,然后,将这两点间划一条直线,在图中间 RCF 标尺上的交叉点即为相应的离心力数值。注意,若已知的转数值处于 rpm 标尺的右边,则应读取 RCF 标尺右边的数值。同样,转数值处于 rpm 标尺左边,则读取 RCF 标尺左边的数值。

附录七 某些生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数 (sedimentation coefficient)



附图 各种生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数

附录八 硫酸铵饱和度常用表

(一) 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(25°C)

硫酸铵终浓度,% 饱和度																			
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100		
硫酸铵 初浓度, %饱和度	每 1 升溶液加固体硫酸铵的克数*																		
	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
	50										33	66	101	137	176	214	302	392	
	55											33	67	103	141	179	264	353	
	60												34	69	105	143	227	314	
	65													34	70	107	190	275	
	70														35	72	153	237	
75																36	115	198	
80																	77	157	
90																		79	

硫酸铵初浓度, % 饱和度

* 在 25°C 时,硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时,每升溶液所加固体硫酸铵的克数。

(二) 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(0°C)

在 0°C 硫酸铵终浓度, % 饱和和度

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	每 100 毫升溶液加固体硫酸铵的克数																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25	0		2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30	0			2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35	0				2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40	0					2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45	0						2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3

硫酸铵初浓度, % 饱和和度

在 0°C 硫酸铵终浓度, % 饱和度

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
每 100 毫升溶液加固体硫酸铵的克数*																	
50						0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8	
55							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3	
60								0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.1	27.9	
65									0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4	
70										0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9	
75											0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4	
80												0	3.3	6.7	10.3	13.9	
85													0	3.4	6.8	10.5	
90														0	3.4	7.0	
95															0	3.5	
100																0	

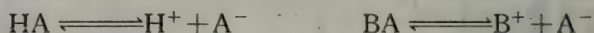
* 在 0°C 时, 硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每 100 毫升溶液所加固体硫酸铵的克数。

附录九 缓冲溶液

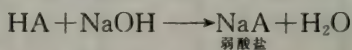
由一定物质所组成的溶液,在加入一定量的酸或碱时,其氢离子浓度改变甚微或几乎不变,此种溶液称为缓冲溶液,这种作用称为缓冲作用,其溶液内所含物质称为缓冲剂。

缓冲剂的组成,多为弱酸及这种弱酸与强碱所组成的盐,或弱碱及这种弱碱与强酸所组成的盐。调节二者的比例可以配制成各种 pH 的缓冲液。

例如:某一缓冲液由弱酸(HA)及其盐(BA)所组成,它的解离方程式如下:



若向缓冲液中加入碱(NaOH),则:



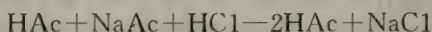
若向缓冲液中加入酸(HCl),则:



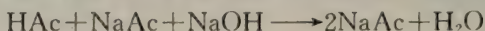
由此可见,向缓冲液中加入酸或加碱,主要的变化就是溶液内弱酸(HA)的增加或减少。由于弱酸(HA)的解离度很小,所以它的增加或减少对溶液内氢离子浓度改变不大,因而起到缓冲作用。

实例一:乙酸钠(以 NaAc 表示)与乙酸(以 HAc 表示)缓冲液。

加入盐酸溶液,其缓冲作用:

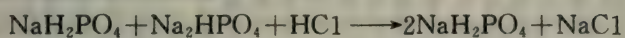


加入氢氧化钠溶液,其缓冲作用:

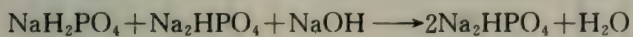


实例二：磷酸氢二钠与磷酸二氢钠缓冲液。

加入盐酸溶液，其缓冲作用：



加入氢氧化钠溶液，其缓冲作用：



(一) 一些常用缓冲剂的化合物的酸解离常数

化 合 物	pK 酸	化 合 物	pK 酸	化 合 物	pK 酸
二苯胺	0.85	柠檬酸, K ₂	4.75	二乙基巴比妥酸	7.98
草酸, K ₁	1.30	苹果酸, K ₂	5.05	三-(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)	8.08
顺丁烯二酸, K ₁	1.92	吡啶	5.19	甘氨酸, K ₂	8.13
磷酸, K ₁	1.96	苯二甲酸, K ₂	5.40	2,4-或 2,5-二甲基咪唑	8.36
乙二胺四乙酸 (EDTA), K ₁	2.00	琥珀酸, K ₂	5.60	焦磷酸, K ₄	8.44
甘氨酸, K ₁	2.45	丙二酸, K ₂	5.66	2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇	8.67
乙二胺四乙酸 (EDTA), K ₂	2.67	羟胺	6.09	吡啶	8.85
吡啶	2.80	组氨酸, K ₂	6.10	二乙醇胺	8.88
丙二酸, K ₁	2.85	二甲胂酸	6.15	精氨酸, K ₂	9.04
苯二甲酸, K ₁	2.90	乙二胺四乙酸 (EDTA), K ₃	6.16	硼酸	9.23
酒石酸, K ₁	2.96	3,β-二甲基戊二酸, K ₂	6.20	氢氧化铵	9.30
延胡索酸, K ₁	3.02	顺丁烯二酸, K ₂	6.22	乙醇胺	9.44
柠檬酸, K ₁	3.10	碳酸, K ₁	6.35	甘氨酸, K ₂	9.60
甘氨酸, K ₁	3.15	柠檬酸, K ₃	6.40	三甲胺	9.87
α,β-二甲基戊二酸, K ₁	3.66	4-或 5-羟甲基咪唑	6.40	乙二胺, K ₂	10.11
甲酸	3.75	焦磷酸, K ₃	6.54	乙二胺四乙酸 (EDTA), K ₁	10.26
巴比妥酸	3.79	砷酸, K ₂	6.60	碳酸, K ₂	10.32
乳酸	3.89	磷酸, K ₂	6.70	乙胺	10.67
琥珀酸, K ₁	4.18	咪唑	6.95	甲胺	10.70
苯甲酸	4.20	2-氨基嘌呤	7.14	二甲胺	10.70
草酸, K ₂	4.26	乙二胺, K ₁	7.30	二乙胺	11.00
酒石酸, K ₂	4.37	2,4,6-三甲吡啶	7.32	吡啶, K ₂	11.12
延胡索酸, K ₂	4.39	4-或 5-甲基咪唑	7.52	磷酸, K ₃	12.32
乙酸	4.73	三乙醇胺	7.77	精氨酸, K ₃	12.50

(二) 常用缓冲溶液的配制方法

1. 甘氨酸-盐酸缓冲液 (0.05mol/L)

X 毫升 0.2mol/L 甘氨酸 + Y 毫升 0.2mol/L HCl, 再加水稀释至 200 毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸分子量 = 75.07,

0.2M 甘氨酸溶液含 15.01 克/升。

2. 邻苯二甲酸-盐酸缓冲液 (0.05mol/L)

X 毫升 0.2mol/L 邻苯二甲酸氢钾 + Y 毫升 0.2mol/L HCl, 再加水稀释到 20 毫升

pH(20°C)	X	Y	pH(20°C)	X	Y
2.2	5	4.670	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	3.6	5	0.597
2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.032			

邻苯二甲酸氢钾分子量 = 204.23

0.2M 邻苯二甲酸氢钾溶液含 40.85 克/升

3. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0. 2mol/L Na_2HPO_4 (毫升)	0. 1mol/L 柠檬酸 (毫升)	pH	0. 2mol/L Na_2HPO_4 (毫升)	0. 1mol/L 柠檬酸 (毫升)
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Na_2HPO_4 分子量=141.98; 0.2mol/L 溶液为 28.40 克/升。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量=178.05; 0.2mol/L 溶液含 35.61 克/升。

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分子量=210.14; 0.1mol/L 溶液为 21.01 克/升。

4. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

pH	钠离子浓度 (mol/L)	柠檬酸(克) $C_6O_7H_8 \cdot H_2O$	氢氧化钠(克) $NaOH 97\%$	盐酸(毫升) HCl (浓)	最终体积(升) ^①
2.2	0.20	210	84	160	10
3.1	0.20	210	83	116	10
3.3	0.20	210	83	106	10
4.3	0.20	210	83	45	10
5.3	0.35	245	144	68	10
5.8	0.45	285	186	105	10
6.5	0.38	266	156	126	10

① 使用时可以每升中加入1克酚,若最后pH值有变化,再用少量50%氢氧化钠溶液或浓盐酸调节,冰箱保存。

5. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1mol/L)

pH	0.1mol/L 柠檬酸(毫升)	0.1mol/L 柠檬酸钠(毫升)	pH	0.1mol/L 柠檬酸(毫升)	0.1mol/L 柠檬酸钠(毫升)
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 、分子量 210.14; 0.1mol/L 溶液为 21.01 克/升。
 柠檬酸钠 $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 、分子量 = 294.12; 0.1mol/L 溶液为 29.41 克/升。

6. 乙酸-乙酸钠缓冲液 (0.2mol/L)

pH(18°C)	0.2mol/LNaAc (毫升)	0.2mol/LHAc (毫升)	pH(18°C)	0.2mol/LNaAc (毫升)	0.2mol/LHAc
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

NaAc · 3H₂O 分子量=136.09;
0.2mol/L 溶液为 27.22 克/升。

7. 磷酸盐缓冲液

(1) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.2mol/L)

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4 (毫升)	0.2mol/L NaH_2PO_4 (毫升)	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4 (毫升)	0.2mol/L NaH_2PO_4 (毫升)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 178.05; 0.2mol/L 溶液为 35.61 克/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 358.22; 0.2mol/L 溶液为 71.64 克/升 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 138.01; 0.2mol/L 溶液为 27.6 克/升 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 156.03; 0.2mol/L 溶液为 31.21 克/升

(2) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液 (1/15mol/L)

pH	mol/L/15 Na_2HPO_4 (毫升)	mol/L/15 KH_2PO_4 (毫升)	pH	mol/L/15 Na_2HPO_4 (毫升)	mol/L/15 KH_2PO_4 (毫升)
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0
6.98	6.00	4.00			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 178.05; 1/15mol/L 溶液为 11.876 克/升。
 KH_2PO_4 分子量 = 136.09; 1/15mol/L 溶液为 9.078 克/升。

8. 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(0.05(mol/L)

X 毫升 0.2mol/LKH₂PO₄+Y 毫升 0.2mol/LNaOH 加水稀释至 20 毫升

pH(20°C)	X(毫升)	Y(毫升)	pH(20°C)	X(毫升)	Y(毫升)
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

9. 巴比妥钠-盐酸缓冲液(18°C)

pH	0.04mol/L 巴比妥钠溶液(毫升)	0.2mol/L 盐酸(毫升)	pH	0.04mol/L 巴比妥钠溶液(毫升)	0.2mol/L 盐酸(毫升)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21		100	

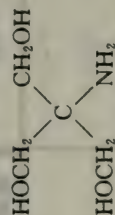
巴比妥钠盐分子量=206.18;0.04mol/L 溶液为 8.25 克/升

10. Tris-盐酸缓冲液(0.05mol/L, 25°C)

50 毫升 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液与 X 毫升 0.1mol/L 盐酸混匀后,加水稀释至 100 毫升。

pH	X(毫升)	pH	X(毫升)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

三羟甲基氨基甲烷(Tris)



分子量=121.14;

0.1mol/L 溶液为 12.114 克/升。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳,使用时注意将瓶盖严。

11. 硼酸-硼砂缓冲液(0.2mol/L 硼酸根)

pH	0.05mol/L 硼砂 (毫升)	0.2mol/L 硼酸 (毫升)	pH	0.05mol/L 硼砂 (毫升)	0.2mol/L 硼酸 (毫升)
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分子量 = 381.43; 0.05mol/L 溶液 (= 0.2mol/L 硼酸根) 含 19.07 克/升。
 硼酸 H_3BO_3 , 分子量 = 61.84, 0.2mol/L 溶液为 12.37 克/升。
 硼砂易失去结晶水, 必须在带塞的瓶中保存。

12. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L)
X毫升0.2mol/L甘氨酸+Y毫升0.2mol/LNaOH加水稀释至200毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸分子量=75.07;0.2mol/L溶液含15.01克/升。

13. 硼砂-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L 硼酸根)
X毫升0.05mol/L硼砂+Y毫升0.2mol/LNaOH加水稀释至200毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
9.3	50	6.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 分子量=381.43;0.05mol/L溶液为19.07克/升。

14. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (0.1mol/L)

 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 存在时不得使用

pH		0.1mol/L Na_2CO_3 (毫升)	0.1mol/L NaHCO_3 (毫升)
20°C	37°C		
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 分子量 = 286.2; 0.1mol/L 溶液为 28.62 克/升。 NaHCO_3 分子量 = 84.0; 0.1mol/L 溶液为 8.40 克/升。

15. 氯化钾-盐酸缓冲液(pH1.0~2.2)(25°C)

25ml 0.2mol/L KCl(含 14.919g/1000ml)+x ml 0.2mol/L 盐酸,加水释至 100ml。

pH	0.2mol/L HCL (x ml)	水 (y ml)	pH	0.2mol/L HCL (x ml)	水 (y ml)	pH	0.2mol/L HCL (x ml)	水 (y ml)
1.0	67.0	33.0	1.5	20.7	79.3	2.0	6.5	93.5
1.1	52.8	47.2	1.6	16.2	83.8	2.1	5.1	94.9
1.2	42.5	57.5	1.7	13.0	87.0	2.2	3.9	96.1
1.3	33.6	66.4	1.8	10.2	89.8			
1.4	26.6	73.4	1.9	8.1	91.9			

16. 二甲基戊二酸-氢氧化钠缓冲液(pH3.2~7.6)

0.1mol/L β ; β' -二甲基戊二酸,含 β ; β' -二甲基戊二酸 16.02g/1000ml

pH	0.1mol/L β ; β' -二甲基戊二酸(ml)	0.2mol/L NaOH (ml)	水 (ml)
3.2	50	4.15	45.85
3.4	50	7.35	42.65
3.6	50	11.0	39.00
3.8	50	13.7	36.30
4.0	50	16.65	33.35
4.2	50	18.40	31.60
4.4	50	19.60	30.40
4.6	50	20.85	29.15
4.8	50	21.95	27.05
5.0	50	23.10	26.90
5.2	50	24.50	25.50
5.4	50	26.00	24.00
5.6	50	27.90	22.10
5.8	50	29.85	20.15
6.0	50	32.50	17.50
6.2	50	35.25	14.75
6.4	50	37.75	12.25
6.6	50	42.35	7.65
6.8	50	44.00	6.00
7.0	50	45.20	4.80
7.2	5.0	46.05	3.95
7.4	5.0	46.60	3.40
7.6	5.0	47.00	3.00

本缓冲溶液适用于要求紫外吸收值较低的酶学研究工作。

17. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH8.6~10.6)(25°C)

25ml0.2mol/L 甘氨酸含:(15.01g/1000ml)+xmol0.2mol/l NaOH.加水至 100ml.

pH	0.2mol/L NaOH(x ml)	水 (y ml)	pH	0.2mol/L NaOH (x ml)	水 (y ml)
8.6	2.0	98.0	9.6	11.2	88.2
8.8	3.0	97.0	9.8	13.6	86.4
9.0	4.4	95.6	10.0	16.0	84.0
9.2	6.0	94.0	10.4	19.3	80.7
9.4	8.4	91.6	10.6	22.8	77.2

18. 丁二酸-氢氧化钠缓冲液(pH3.8~6.0)(25°C)

0.2mol/L 丁二酸:含 C₄H₆O₄23.62g/1000ml.

pH	0.2mol/L 丁二酸 (ml)	0.2mol/L NaOH (ml)	水 (ml)	pH	0.2mol/L 丁二酸 (ml)	0.2mol/L NaOH (ml)	水 (ml)
3.8	25	7.5	67.5	5.0	25	26.7	48.3
4.0	25	10.0	65.0	5.2	25	30.3	44.7
4.2	25	13.3	61.7	5.4	25	34.2	40.8
4.4	25	16.7	58.3	5.6	25	37.5	37.5
4.6	25	20.0	55.0	5.8	25	40.7	24.3
4.8	25	23.5	51.5	6.0	25	43.5	22.5

19. 邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH4.1~5.9)(25°C)

50ml0.1mol/L 邻苯二甲酸氢钾(20.42g/L)+xmol0.1mol/L NaOH,加水稀释至100ml。

pH	0.1mol/L NaOH (xmol)	水 (ml)	pH	0.1mol/L NaOH (xmol)	水 (ml)	pH	0.1mol/L NaOH (xmol)	水 (ml)
4.1	1.2	98.8	4.8	16.5	83.5	5.5	36.6	63.4
4.2	3.0	97.0	4.9	19.4	80.6	5.6	38.8	61.2
4.3	4.7	95.3	5.0	22.6	77.4	5.7	40.6	59.4
4.4	6.6	93.4	5.1	25.5	74.5	5.8	42.3	57.7
4.5	8.7	91.3	5.2	28.8	71.2	5.9	43.7	56.3
4.6	11.1	88.9	5.3	31.6	68.4			
4.7	13.6	86.4	5.4	34.1	65.9			

20. 2,4,6-三甲基吡啶-盐酸缓冲液(pH6.4~8.3)

0.2mol/L 2,4,6-三甲基吡啶:含 C₈H₁₁N24. 24g/1000ml.

pH		0.2mol/L 三甲基吡啶(ml)	0.2mol/L HCl (ml)	水 (ml)
23°C	37°C			
6.4	6.4	25	22.50	52.50
6.6	6.5	25	21.25	53.75
6.8	6.7	25	20.00	55.00
6.9	6.8	25	18.75	56.25
7.0	6.9	25	17.50	57.50
7.1	7.0	25	16.25	58.75
7.2	7.1	25	15.00	60.00
7.3	7.2	25	13.75	61.25
7.4	7.3	25	12.50	62.50
7.5	7.4	25	11.25	63.75
7.6	7.5	25	10.00	65.00
7.7	7.6	25	8.75	66.25
7.8	7.7	25	7.50	67.50
7.9	7.8	25	6.25	68.75
8.0	7.9	25	5.00	70.00
8.2	8.1	25	3.75	71.25
8.3	8.3	25	2.50	72.50

21. 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0~10.2)

pH	0.1mol/L KCl-H ₃ BO ₄ (ml)	0.1mol/L NaOH (ml)	水 (ml)
8.0	50	3.9	46.1
8.1	50	4.9	45.1
8.2	50	6.0	44.0
8.3	50	7.2	42.8
8.4	50	8.6	41.4
8.5	50	10.1	39.9
8.6	50	11.8	37.2
8.7	50	13.7	36.2
8.8	50	15.8	34.2
8.9	50	18.1	31.9
9.0	50	20.8	29.2
9.1	50	23.6	26.4
9.2	50	26.4	23.6
9.3	50	29.3	20.7
9.4	50	32.1	17.9
9.5	50	34.6	15.4
9.6	50	38.9	13.1
9.7	50	36.9	11.1
9.8	50	40.6	9.4
9.9	50	42.2	7.8
10.0	50	43.7	6.3
10.1	50	45.0	5.0
10.2	50	46.2	3.8

0.1mol/L KCl-H₃BO₄ 混合液各含 KCl 7.455g/1000ml 和 H₃PO₄ 9.184g/1000ml。

22. 二乙醇胺-盐酸缓冲液(pH8.0~10.0)(25°C)

25ml0.2mol/L 二乙醇胺含：(21.02g/1000ml)+xmol0.2mol/L 盐酸，加水至 100ml。

pH	0.2mol/L HCl (xml)	水 (ym)	pH	0.2mol/L HCl (xml)	水 (ym)
8.0	22.95	77.05	9.1	10.20	89.80
8.3	21.00	79.00	9.3	7.80	92.20
8.5	18.85	81.15	9.5	5.55	94.45
8.7	16.35	83.65	9.9	3.45	96.55
8.9	13.55	86.45	10.0	1.80	98.20

23. 硼砂-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L 硼酸根)(pH9.3~10.1)

25ml0.05mol/L 硼砂含：(19.07g/1000ml)+xmol0.2mol/L NaOH，加水稀释至 1000ml。

pH	0.05mol/L 硼砂 (xml)	0.2mol/L NaOH (ym)	水 (ml)	pH	0.05mol/L 硼砂 (xml)	0.2mol/L NaOH (ym)	水 (ml)
9.3	25.0	3.0	72.0	9.8	25.0	17.0	58.0
9.4	25.0	5.5	69.5	10.0	25.0	21.5	53.5
9.6	25.0	11.5	63.5	10.1	25.0	23.0	52.0

24. 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液(pH11.0~11.9)(25°C)

50ml0.05mol/L Na_2HPO_4 + xml0.1mol/L NaOH, 加水至 100ml。

pH	0.1mol/L NaOH (xmol)	水 (yml)	pH	0.1mol/L NaOH (xmol)	水 (yml)
11.0	4.1	95.9	11.5	11.1	88.9
11.1	5.1	94.9	11.6	13.5	86.5
11.2	6.3	93.7	11.7	16.2	83.8
11.3	7.6	92.4	11.8	19.4	80.6
11.4	9.1	90.9	11.9	23.0	77.0

25. 氯化钾-氢氧化钠缓冲液(pH12.0~13.0)(25°C)

25ml0.2mol/L 氯化钾 (14.91g/1000ml) + xml0.2mol/L NaOH, 加水至 100ml。

pH	0.2mol/L NaOH (xmol)	水 (ml)	pH	0.2mol/L NaOH (xmol)	水 (ml)
12.0	6.0	94.0	12.6	25.6	74.4
12.1	8.0	92.0	12.7	32.2	67.8
12.2	10.2	89.8	12.8	41.2	58.8
12.3	12.2	87.8	12.9	53.0	47.0
12.4	16.8	83.2	13.0	66.0	34.0
12.5	24.4	75.6			

26. 广范围缓冲液(pH2.6~12.0)(18°C)

混合液 A: 6.008g 柠檬酸, 3.893g 磷酸二氢钾, 1.769g 硼酸和 5.266g 巴比妥加蒸馏水容至 1000ml。
每 100ml 混合液 A 加 0.2mol/L NaOH xml 至所需 pH 值。

pH	混合液 A (ml)	0.2mol/L NaOH (xml)	水 (ml)	pH	混合液 A (ml)	0.2mol/L NaOH (xml)	水 (ml)
2.6	100	2.0	898.0	6.0	100	38.9	861.1
2.8	100	4.3	896.7	6.2	100	41.2	858.8
3.0	100	6.4	893.6	6.4	100	43.5	856.5
3.2	100	8.3	891.7	6.6	100	46.0	854.0
3.4	100	10.1	889.9	6.8	100	48.3	851.7
3.6	100	11.8	888.2	7.0	100	50.6	849.4
3.8	100	13.7	886.3	7.2	100	52.9	847.1
4.0	100	15.5	884.5	7.4	100	55.8	844.2
4.2	100	17.6	882.4	7.6	100	58.6	841.4
4.4	100	19.9	880.1	7.8	100	61.7	838.3
4.6	100	22.4	877.6	8.0	100	63.7	836.3
4.8	100	24.8	875.2	8.2	100	65.6	834.4
5.0	100	27.1	872.9	8.4	100	67.5	832.5
5.2	100	29.5	870.5	8.6	100	69.3	830.7
5.4	100	31.8	868.2	8.8	100	71.0	829.0
5.6	100	34.2	865.8	9.0	100	72.7	827.3
5.8	100	36.5	863.5	9.2	100	74.0	826.0
9.4	100	75.9	824.1	10.8	100	84.9	815.1
9.6	100	77.6	822.4	11.0	100	86.0	814.0
9.8	100	79.3	820.7	11.2	100	87.7	812.3
10.0	100	80.8	819.2	11.4	100	89.7	810.3
10.2	100	82.0	818.0	11.6	100	92.0	808.0
10.4	100	82.9	817.1	11.8	100	95.0	805.0
10.6	100	83.9	816.1	12.0	100	99.6	800.4

27. 离子强度恒定的缓冲液 (pH2.0~12.0)

按下表配制 0.1I 或 0.2I 的缓冲液, 加蒸馏水至 2000ml。适用于电泳中的缓冲液。

pH	5mol/L NaCl(ml)		1mol/L 甘氨酸- 1mol/L NaCl(ml)	2mol/L HCl (ml)	2mol/L NaOH (ml)	2mol/L NaAC (ml)	8.5mol/L HAC (ml)	0.5mol/L NaH ₂ PO ₄ (ml)	4mol/L Na ₂ HPO ₄ (ml)	0.5mol/L 二乙基巴 比妥钠 (ml)
	配成 0.1I 时	配成 0.2I 时								
2.0	32	72	10.6	14.7						
2.5	32	72	22.8	8.6						
3.0	32	72	31.6	4.2						
3.5	32	72	36.6	1.7						
4.0	32	72				20.0	33.7			
4.5	32	72				20.0	11.5			
5.0	32	72				20.0	3.7			
5.5	32	72				20.0	1.2			
6.0	32	72						9.2	6.6	
6.5	32	72						16.6	3.7	
7.0	32	72						22.7	1.6	
7.5	32	72						24.3	0.5	
8.0	32	72		10.4						80.0
8.5	32	72		5.3						80.0
9.0	32	72		2.0						80.0
9.5	32	72	34.5		2.7					
10.0	32	72	28.8		5.6					
10.5	32	72	23.2		8.4					
11.0	32	72	19.6		10.2					
11.5	32	72	17.6		11.2					
12.0	32	72	15.2		12.4					

附录十 层析数据表

(一) 各种离子交换树脂类似商品对照表

国内产品型号	相 应 国 外 树 脂 型 号				树脂类型
	英 国	美 国	德 国	日 本	联 苏
华东强酸阳 # 42	Zerolit 215 Zeo Karb 215 Zeo Karb 315	Amberlite IR-100	Duolite C ₃ Dowex 30	Wofatit KS	磺化酚 醛 型
华东弱酸阳 # 122	Zerolit 216 Zeo Karb 216		Duolite CS-100	Wofatit C	水杨酸 酚醛型
弱酸 101×1~20 或 724(101×4)	Zerolit 226 Zeo Karb 226	Amberlite IRC-50		Wofatit CP-300	丙烯酸 型弱酸
强酸 1×1~24 或 732(1×7)	Zerolit 225 Zeo Karb 225	Amberlite IR-120	Duolite C20	Wofatit KPS200	磺化聚 苯乙烯
弱碱 320	Zerolit E De Acidite E	Amberlite IR-48	Duolite A2	WofatitM WofatitN	酚醛型

续表

国内产品型号	相 应 国 外 树 脂 型 号				树 脂 类 型		
	英 国	美 国	德 国	日 本	苏 联		
强碱 201 或 717 (201×7)	De Acidite FF	Amberlite IR-400	Dowex 1	神胶 800	AB-17	苯乙烯 型强碱	
强碱 202×1~24	Zerolit FF	Amberlite IR-410	Dowex 2	神胶 801	AB-18		
弱碱 311 或 704 (311×2)	Zerolit G	Amberlite IR-45	Dowex 3		AH-22	苯乙烯 型弱碱	
弱碱 301	Zerolit H	De Acidite H			AH-18		
701(弱碱 330)					ЭТЭ-10П	环氧型 弱碱	
脱色树脂 1 号或 通用 1 号	Decolorite						
脱色树脂 2 号						多孔 弱碱	
						多孔 弱酸	

[注]1. 国产树脂编号:1~100 为强酸型树脂,101~200 为弱酸型树脂;201~300 为强碱型树脂,301~400 为弱碱型树脂。

2. 交联度的表示:如 201×7201 为强碱型树脂编号,7 为交联度;又如 1×7.1 为强酸型树脂编号,7 为交联度;又如 101×1~20101 为弱酸型树脂编号,1 到 20 为交联度。

(二) 葡聚糖凝胶的技术数据

分子筛类型	干颗粒直径/ μ	分子量分级的范围		床体积/ (ml/g 干胶)	得水值 (ml/ g 干凝胶)	溶胀最少平衡时间 /(h)			柱头压力 * / (kPa) (2.5cm 直径柱)
		肽及球型 蛋白质	葡聚糖 (线性分子)			室	温	沸水浴	
Sephadex G-10	40~120	~700	~700	2~3	1.0 \pm 0.1	3		1	
Sephadex G-15	40~120	~1500	~1500	2.5~3.5	1.5 \pm 0.2	3		1	
Sephadex G-25	100~300 (=50~100 目)								
粗级	50~150								
中级	(=100~200 目)	1000~5000	100~5000	4~6	2.5 \pm 0.2	6		2	
细级	20~80								
超细	(=200~400 目)								
	10~40								
Sephadex G-50	100~300								
粗级	50~150	1500~	500~	9~11	5.0 \pm 0.3	6		2	
中级	20~80	30 000	10 000						
细级	10~40								
超细									

续表

分子筛类型	干颗粒直径/ μ	分子量分级的范围		床体积/ (ml/g 干胶)	得水值 (ml) /g 干凝胶)	溶胀最少平衡时间 /(h)		柱头压力 * / (kPa)(2.5cm 直径柱)
		肽及球型 蛋白质	葡萄糖 (线性分子)			室	温沸水浴	
Sephadex G-75 超细	40~120 10~40	3000~ 70000	1000~ 50000	12~15	7.5 \pm 0.5	24	3	3.9~15.6
Sephadex G-100 超细	40~120 10~40	4000~ 150000	1000~ 100000	15~20	10.0 \pm 1.0	48	5	23.5~94
Sephadex G-150 超细	40~120 10~40	5000~ 40000	1000~ 150000	20~30 18~22	15.0 \pm 1.5	72	5	0.9~3.6
Sephadex G-200 超细	40~120 10~40	5000~ 80000	1000~ 200000	30~40 20~25	20.0 \pm 2.0	72	5	0.4~1.6

* 1mmH₂O=9.806375Pa.

(三) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

Bio-Gel 类型	水合网目	水合质点 直径/ (μm)	操作范围 (分子质量)	得 水 值 (ml/g 干凝胶)	柱床容积 (ml/g 干凝胶)	溶胀时间/h. 温度	
						20°C	100°C
Bio-Gel P-2	50~100	150~300					
Bio-Gel P-2	100~200	75~150	100~1800	1.5	3.0	4	2
Bio-Gel P-2	200~400	40~75					
Bio-Gel P-2	<400	<40					
Bio-Gel P-4	50~100	150~300					
Bio-Gel P-4	100~200	75~150	800~4000	2.4	4.8	4	2
Bio-Gel P-4	200~400	40~75					
Bio-Gel P-4	<400	<40					
Bio-Gel P-6	50~100	150~300					
Bio-Gel P-6	100~200	75~150	1000~6000	3.7	7.4	4	2
Bio-Gel P-6	200~400	40~75					
Bio-Gel P-6	<400	<40					
Bio-Gel P-10	50~100	150~300					
Bio-Gel P-10	100~200	75~150	1500~20000	4.5	9.0	4	2
Bio-Gel P-10	200~400	40~75					
Bio-Gel P-10	<400	<40					
Bio-Gel P-30	50~100	150~300					
Bio-Gel P-30	100~200	75~150	2500~40000	5.7	11.4	12	3
Bio-Gel P-30	<400	<40					

续表

Bio-Gel 类型	水合网目	水合质点 直径/ μm	操作范围 (分子质量)	得水值 (ml/g 干凝胶)	柱床容积 (ml/g 干凝胶)	溶胀时间/h, 温度	
						20°C	100°C
Bio-Gel P-60	50~100	150~300					
Bio-Gel P-60	100~200	75~150	3000~60000	7.2	14.4	12	3
Bio-Gel P-60	<400	<40					
Bio-Gel P-100	50~100	150~300					
Bio-Gel P-100	100~200	75~150	5000~100000	7.5	15.0	24	5
Bio-Gel P-100	<400	<40					
Bio-Gel P-150	50~100	150~300					
Bio-Gel P-150	100~200	75~150	15000~150000	9.2	18.4	24	5
Bio-Gel P-150	<400	<40					
Bio-Gel P-200	50~100	150~300					
Bio-Gel P-200	100~200	75~150	30000~200000	14.7	24.4	48	5
Bio-Gel P-200	<400	<40					
Bio-Gel P-300	50~100	150~300					
Bio-Gel P-300	100~200	75~150	60000~400000	18.0	36.0	48	5
Bio-Gel P-300	<400	<40					

注:数据选自 Bio-Rad Laboratories, "A Laboratory Manual on Gel Chromatography".

(四) 琼脂糖·凝胶的技术数据

名称、型号	凝胶内琼脂糖百分含量(W/W)	排除的下限(分子量)	分级分离的范围(分子量)	生产厂商
Sephacrose 4B	4		$0.3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$	Pharmacia, Uppsala, Sweden.
Sephacrose 2B	2		$2 \times 10^6 \sim 25 \times 10^6$	
Sagavac 10	10	2.5×10^5	$1 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$	Seravac Laboratories, Maidenhead, England.
Sagavac 8	8	7×10^5	$2.5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$	
Sagavac 6	6	2×10^6	$5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	
Sagavac 4	4	15×10^6	$2 \times 10^5 \sim 15 \times 10^6$	
Sagavac 2	2	150×10^6	$5 \times 10^5 \sim 15 \times 10^7$	
Bio-Gel A-0.5M	10	0.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$	Bio-Rad Laboratories, California, U. S. A.
Bio-Gel A-1.5M	8	1.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	
Bio-Gel A-5M	6	5×10^6	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	
Bio-Gel A-15M	4	15×10^6	$4 \times 10^4 \sim 15 \times 10^6$	
Bio-Gel A-50M	2	50×10^6	$1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^6$	
Bio-Gel A-150M	1	150×10^6	$1 \times 10^6 \sim 150 \times 10^6$	

* 琼脂糖是琼脂内非离子型的组分,它在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$, pH 4~9 范围内是稳定的。



S0014798

(五) 各种凝胶所允许的最大操作压

凝 胶	建议的最大静水压 (cmH ₂ O)
Sephadex	
G-10	100
G-15	100
G-25	100
G-50	100
Sephadex G-75	50
Sephadex G-100	35
Sephadex G-150	15
Sephadex G-200	10
Bio-Gel	
P-2	100
P-4	100
P-6	100
P-10	100
P-30	100
P-60	100
Bio-Gel P-100	60
Bio-Gel P-150	30
Bio-Gel P-200	20
Bio-Gel P-300	15
Sepharose	
2B	1 ^a
4B	1
Bio-Gel	
A-0.5M	100
A-1.5M	100
A-5M	100
Bio-Gel A-15M	90
Bio-Gel A-50M	50
Bio-Gel A-150M	30

a. 每厘米凝胶长度。

收到期

98. 5. 13.

来源

科技书店

书价

11.80

单据号

0011116

开票日期

98. 5. 13.

26743

生物化学实验

借者单位	借者姓名	借出
------	------	----

1988.8.8	198.8.8	1
----------	---------	---

88 5/27 6 08

68

58.173057
273

注 意

- 1 借书到期请即还
- 2 请勿在书上批改折角。
- 3 借去图书如有污损等情形须照章赔偿

26743

京卡 0701

责任编辑 黄汉平

封面设计 汪 卉

ISBN 7-307-02492-6



9 787307 024922 >

ISBN 7-307-02492-6/Q · 60

定价:11.80 元

